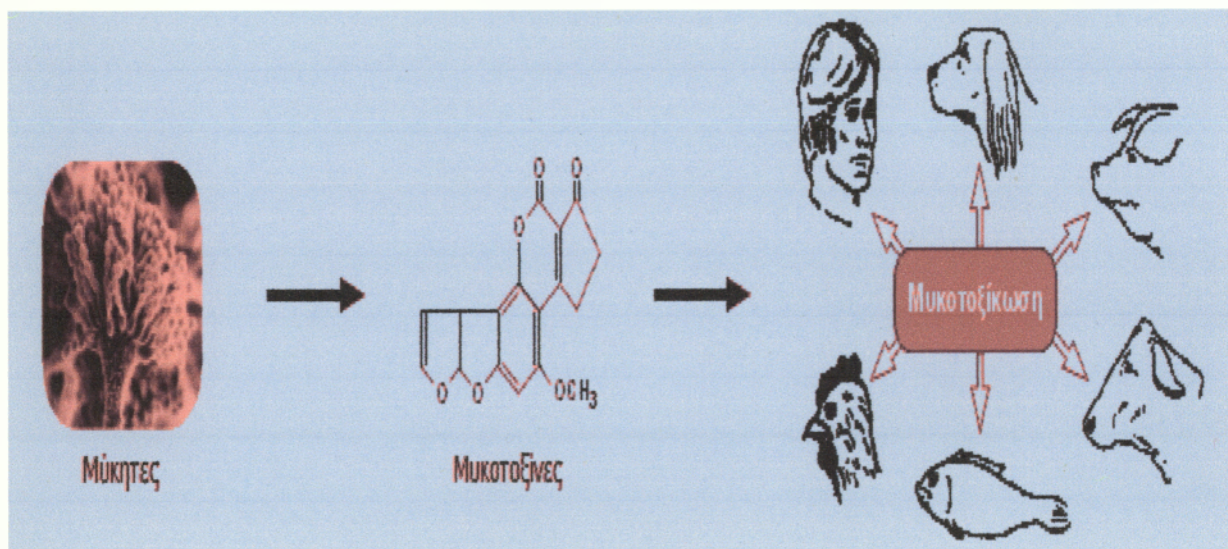


Α. Τ.Ε.Ι ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:
«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ»



ΜΠΟΡΟΥΛΙΤΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΒΑΡΖΑΚΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 4 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ | 6 |
| 1.1 ΓΕΝΙΚΑ | 6 |
| 1.2 ΕΙΔΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ | 7 |
| 1.3 ΤΡΙΧΟΘΥΚΕΝΙΑ | 7 |
| 1.2.2 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ | 8 |
| 1.2.2.1 ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΩΝ | 10 |
| 1.2.3 ΦΟΥΜΟΣΙΝΗ | 12 |
| 1.2.4 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ | 13 |
| 1.2.5 ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ | 20 |
| 1.2.5.1 ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ | 20 |
| 1.2.5.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗΣ | 21 |
| 1.2.5.3 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ | 21 |
| 1.2.5.4 ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗΣ | 22 |
| 1.2.5.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗΣ ΣΤΙΣ ΣΥΓΚΟΜΙΔΕΣ | 22 |
| 1.2.5.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ | 22 |
| 1.2.6 ΚΙΤΡΙΝΙΝΗ | 24 |
| 1.2.7 ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ERGOT | 24 |
| 1.2.8 ΠΑΤΟΥΛΙΝΗ | 26 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ | 27 |
| 2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ | 28 |
| 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ | 34 |
| 2.2.1 ΥΓΡΗ – ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ | 35 |
| 2.2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ | 35 |
| 2.3 ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ | 36 |
| 2.3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ | 36 |
| 2.3.2 ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ | 37 |
| 2.3.3 ΑΕΡΙΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ | 38 |
| 2.4 Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ | 39 |

| | |
|---|----|
| ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ | |
| 2.5 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ | 40 |
| 2.5.1 ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΩΣΗ | 40 |
| 2.5.1.1 ΑΛΛΕΡΓΙΚΗ ΒΡΟΓΧΟΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΩΣΗ | 40 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ | 42 |
| 3.1 ΕΥΡΩΠΑΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ | 42 |
| 3.2 ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ | 44 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ | 45 |
| 4.1 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΠΡΟΛΗΨΗΣ | 48 |
| 4.1.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ | 48 |
| 4.1.2 ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ | 49 |
| 4.1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ | 49 |
| 4.1.4 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ | 50 |
| 4.1.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ | 50 |
| 4.1.6 ΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ | 50 |
| 4.1.7 ΑΠΟΤΟΞΙΝΩΣΗ | 51 |
| 4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ | 51 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 54 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 55 |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πρόβλημα με τις μυκοτοξίνες είναι σημαντικό και δικαιολογημένα προκαλεί ανησυχίες. Αναφέρεται ως παγκόσμιος κίνδυνος και θεωρείται ως μία από τις πλέον σοβαρές προκλήσεις για την ασφάλεια των τροφίμων, την υγεία των ανθρώπων, των ζώων, και για τη σύγχρονη τοξικολογία.

Με τον «όρο» μυκοτοξίνες εννοούμε τοξίνες οι οποίες παράγονται από μύκητες. Συγκεκριμένα πρόκειται για προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων (*Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Penicillium spp*, κ.α). Υπάρχει μία πληθώρα από διάφορες μυκοτοξίνες οι οποίες απαντώνται σε πολλές τροφές, όπως στο γάλα, στα δημητριακά, στους ξηρούς καρπούς, στα αποξηραμένα φρούτα, στο αλεύρι κ.α. που καταναλώνουν καθημερινά οι άνθρωποι, αλλά και σε ζωικές τροφές. Ωστόσο μόνο για κάποιες από αυτές υπάρχουν τεκμηριωμένες μελέτες ενώ ακόμα λιγότερες είναι αυτές, για τις οποίες έχουν προσδιοριστεί τα νόμιμα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης στις τροφές, που καταναλώνονται καθημερινά.

Οι μυκοτοξίνες θεωρούνται γενικά επικίνδυνες ενώσεις που παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων, οι οποίοι αναπτύσσονται σε προϊόντα αγροτικών καλλιεργειών είτε πριν τη συγκομιδή, είτε κατά την αποθήκευσή τους σε γεωργικές εγκαταστάσεις και παραμένουν δραστικές για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά την καταστροφή των μυκήτων από τους οποίους προήλθαν. Η εμφάνισή τους στα τρόφιμα και στα ποτά έχει αναγνωριστεί ως απειλή για την υγεία τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων, είτε αυτή προέρχεται από την άμεση μόλυνση των φυτικών ιστών, είτε από προϊόντα που έχουν παραχθεί από αυτά, είτε από την μεταφορά των μυκοτοξινών και των μεταβολιτών τους στους ζωικούς ιστούς, και κατά συνέπεια στο γάλα, στα αυγά και αλλού. Μερικές από αυτές τις μυκοτοξίνες, όπως για παράδειγμα οι αφλατοξίνες, παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή τοξικότητα, γεγονός που τις καθιστά ενώσεις που χρήζουν ιδιαίτερη προσοχή. ως εκ τούτου κρίνεται απαραίτητο όλα τα αγροτικά προϊόντα που προορίζονται για τον άνθρωπο ή για ζωοτροφές να υποβάλλονται σε συνεχή και σχολαστικό έλεγχο.

Οι έλεγχοι που δημιουργούνται από τις αρμόδιες υγειονομικές αρχές σχεδόν καθημερινά φέρνουν στην επιφάνεια κρούσματα μη παραδεκτών συνθηκών παρασκευής, διακίνησης, αποθήκευσης και διάθεσης τροφίμων με συνέπεια την

απειλή της δημόσιας υγείας, κλονίζοντας την εμπιστοσύνη των καταναλωτών και θέτοντας ακόμα υψηλότερα τον πήχη της ποιότητας και της ασφάλειας.

Για τους λόγους αυτούς τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον από την πλευρά των καταναλωτών για την ποιότητα, την ασφάλεια και τη διατροφική αξία των τροφίμων. Ταυτόχρονα, μια μεγάλη μερίδα των καταναλωτών είναι πολύ καλά ενημερωμένη σχετικά με την ευεργετική επίδραση που μπορεί να έχουν τα τρόφιμα ή κάποια συστατικά αυτών στην ανθρώπινη υγεία, ενώ παράλληλα γίνεται όλο και περισσότερο καχύποπτη ως προς τα ενδεχόμενα προβλήματα υγείας που πιθανόν να προκαλούν κάποια άλλα συστατικά τροφίμων (συντηρητικά). Έτσι, χρόνο με τον χρόνο, καθίσταται περισσότερο εμφανής η σχέση τροφίμων και ανθρώπινης υγείας. Επί πλέον παρατηρείται μια στροφή των καταναλωτών προς τα παραδοσιακά τρόφιμα, τα οποία τις περισσότερες φορές, χαρακτηρίζονται από καλύτερες οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες απ' ότι τα βιομηχανοποιημένα, ενώ τους αποδίδονται και ιδιαίτερα ευεργετικές ιδιότητες σε σχέση με την υγεία του ανθρώπου.

Σύμφωνα με τις τάσεις αυτές είναι δεδομένη η πρόκληση τόσο για τους ερευνητές που ασχολούνται με τον τομέα της επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων και διατροφής όσο και για τη βιομηχανία τροφίμων να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις των καιρών για οικονομικότερη και αποδοτικότερη διεξαγωγή χημικών διεργασιών. Η παραγωγή τροφίμων υψηλής οργανοληπτικής ποιότητας, υψηλής χημικής και μικροβιολογικής ασφάλειας, με ελάχιστη φυσικοχημική επεξεργασία και βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, υψηλής διατροφικής αξίας, με συγκεκριμένες ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου, απαιτεί μια ολιστική προσέγγιση της διατροφικής αλυσίδας, όπου ο άνθρωπος, το περιβάλλον, και τα τρόφιμα θα πρέπει να θεωρηθούν ισοδύναμοι κρίκοι.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι μυκοτοξίνες είναι τοξικές ουσίες οι οποίες παράγονται από την ανάπτυξη μυκήτων σε τροφές και ζωοτροφές. Ο αριθμός των ειδών των μυκήτων έχει υπολογιστεί ότι είναι πάνω από 100.000, ενώ τα είδη των μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές είναι σχετικά λίγα, περίπου 220. Ο γνωστός αριθμός των μυκοτοξινών, ανέρχεται στις 60. Οι πιο γνωστές μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, η T2 τοξίνη, η *Diacetoxyscirpenol*, η ζεαραλενόνη και η ωχρατοξίνη.

Οι μυκοτοξίνες λοιπόν, είναι οργανικές χημικές ουσίες, αλειφατικές ή κυκλικές, απλής σχετικά δομής με σχετικά απλό αριθμό ατόμων άνθρακα και χαμηλού μοριακού βάρους με παρόμοιες μεταξύ τους χημικές ιδιότητες. Είναι παράγωγα ή συγγενείς ενώσεις με την κουμαρίνη, τα τερπενοειδή, ανθρακινόνες, μακρολίδια, στεροειδή, και τετρονικά οξέα. Έχουν διάφορες χημικές δομές και συνεπώς προκαλούν διάφορες δυσάρεστες βιολογικές επιπτώσεις τόσο στην υγεία των ανθρώπων όσων και των ζώων.

Είναι εξαιρετικά επικίνδυνες ενώσεις, που παραμένουν δραστικές για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά την καταστροφή των μυκήτων από τους οποίους προήλθαν. Επιπλέον, επειδή πολλές από αυτές είναι θερμοανθεκτικές, δεν καταστρέφονται σε συνήθεις συνθήκες θερμικής κατεργασίας τροφίμων.

Η δράση τους στους ζώντες οργανισμούς είναι ηπατοτοξική, νεφροτοξική, αιμοτοξική, νευροτοξική, δερματοτοξική και πολλές έχουν καρκινογόνες ή οιστρογόνες ιδιότητες. Μερικές φορές έχουν αντιβιοτική δράση κατά των μικροβίων και καταστρέφουν την μικροβιακή χλωρίδα λ.χ. η πενικιλίνη είναι η μυκοτοξίνη του μύκητα *Penicillium chrysogenum* (δηλαδή της χλωραμφενικόλης).

Ένα πρόβλημα που δεν έχει μελετηθεί αρκετά είναι η δράση, λόγω ενδεχόμενης συνεργίας, δυο μυκοτοξινών που υπάρχουν μαζί στην ίδια ζωοτροφή. Πιθανώς οι μυκοτοξίνες που υπάρχουν σε μη τοξικές ποσότητες στις τροφές όταν

είναι μόνες, να γίνονται τοξικές όταν δρουν μαζί όπως συμβαίνει με πολλά αντιβιοτικά.

Οι συγκεντρώσεις των μυκοτοξινών οι οποίες είναι σημαντικές για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων, μετριούνται συνήθως σε $\mu\text{g}/\text{Kg}$ τροφής (ppb). Οι μυκοτοξίνες, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αναπτύξεως ορισμένων μυκήτων, είτε απεκκρίνονται μέσα στο υλικό που αναπτύσσεται ο μύκητας, είτε κατακρατούνται στο εσωτερικό του κυττάρου των μυκήτων και ελευθερώνονται μετά τη θραύση του μυκηλίου¹.

1.2 ΕΙΔΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

1.2.1 ΤΡΙΧΟΘΥΚΕΝΙΑ

Τα Τριχοθυκένια (*trichothecenes*) αποτελούν ένα είδος μυκοτοξινών που παράγονται από την μούχλα που προκαλούν οι μύκητες του γένους *fusarium*. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφτεί περίπου 190.

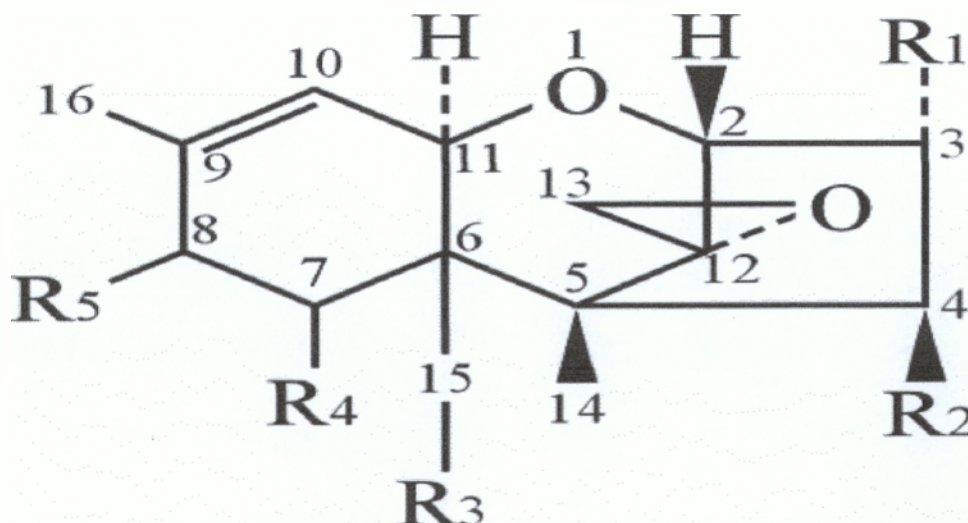
Χωρίζονται σε τέσσερις τύπους όπου ο κάθε ένας χαρακτηρίζεται από ένα ιδιαίτερο γνώρισμα (Βλ. Σχήμα 1).

Τύπος Α: στη θέση C-8 δεν υπάρχει καρβονυλομάδα.

Τύπος Β: στη θέση C-8 υπάρχει καρβονυλομάδα.

Τύπος Γ: διαθέτει και ένα second epoxy group.

Τύπος Δ: διαθέτει μία μακροκυκλική (macrocyclic) δόμηση



Σχήμα 1: Χημική δομή των Τριχοθυκένιων

¹ Διαθέσιμο on line: <http://diagnovet.blogspot.com/2010/05/1.html>

Τα Τριχοθυκένια εμφανίζονται συνήθως σε δημητριακά, όπως ρύζι, αλεύρι, κριθάρι, βρώμη και άλλα τα οποία και μολύνουν. Οι τύποι Α και Β εμφανίζονται ευρύτατα σε πολλά προϊόντα σε αντίθεση με τους τύπους Γ και V τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερη τοξικότητα αλλά εμφανίζονται πιο σπάνια στα τρόφιμα.

Έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένα νοσήματα έχουν άμεση σύνδεση με την έκθεση του ανθρώπου σε τριχοθυκένια ή και παράγωγα αυτών όπως σε δεοξυριβαλενόλη (DON). Παρόλο που η ανθρώπινη έκθεση σε DON μπορεί να είναι μέσα στο εύρος των δόσεων που φαίνεται να προκαλούν ανοσοτοξίκωση στα τρωκτικά, οι πραγματικές συνέπειες που προκαλεί στον άνθρωπο δεν έχουν προσδιοριστεί και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.

1.2.2 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ

Οι Ωχρατοξίνες (*ochratoxins, OT*) παράγονται από διάφορα στελέχη μυκήτων των ειδών *penicillium* και *aspergillus ssp.* (*Aspergillus Ochraeus* και *Aspergillus Carbonarius*), τα οποία αναπτύσσονται σε διάφορες συνθήκες και για το λόγο αυτό λέγεται ότι είναι από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες τοξίνες στις διάφορες τροφές.

Η κύρια τοξίνη αυτής της κατηγορίας είναι η Ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) (βλ. Σχήμα 2), η οποία εμφανίζεται συνήθως στο σίτο, στο καλαμπόκι, στη βρώμη, στον καφέ, στα φυστίκια, στα δημητριακά, στα ξηρά φρούτα, στα σταφύλια, στο κακάο, καθώς επίσης και σε κρέας ή τυρί που έχει παραχθεί από ζώα που έχουν καταναλώσει μολυσμένες τροφές².

Η ΟΤΑ είναι μια τοξίνη που παράγεται φυσικά από διάφορα είδη *Aspergillus* και *Penicillium*. Αυτά τα είδη των στελεχών *Aspergillus* και *Penicillium* βρίσκονται σε διάφορες περιοχές και ευδοκιμούν σε διαφορετικά κλίματα και σε διάφορες εγκαταστάσεις αποθήκευσης τροφίμων και έτσι η μόλυνση των συγκομιδών τροφίμων με ΟΤΑ μπορεί να εμφανιστεί παγκοσμίως.

Η ΟΤΑ μπορεί να βρεθεί σε μία μεγάλη ποικιλία τροφίμων και ποτών όπως τα δημητριακά, η μύρα, το κρασί, το κακάο, ο καφές, τα ξηρά φρούτα αμπέλων και τα καρυκεύματα, καθώς επίσης και σε μερικά προϊόντα κρέατος, ως αποτέλεσμα της μόλυνσης της ζωικής τροφής.

² Understanding Mycotoxins, Patricia A. Murphy, Ph.D., Suzanne Hendrich, Ph.D., Cindy Landgren, Ph.D., Foodtechnology 06(2006)

Η OTA είναι τοξική στα ζώα, ενώ η κύρια επίδραση της είναι η πρόκληση νεφροτοξικότητας. Θεωρείται επίσης ανοσοτοξική, υπεύθυνη για τερατογενέσεις καθώς επίσης έχει ταξινομηθεί από τον IARC (International Agency for Research on Cancer, Διεθνής Οργανισμός για Έρευνα στον Καρκίνο) ως καρκινογόνο κατηγορίας 2B (class 2B carcinogen), πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο (Romeroa et al, 2005).

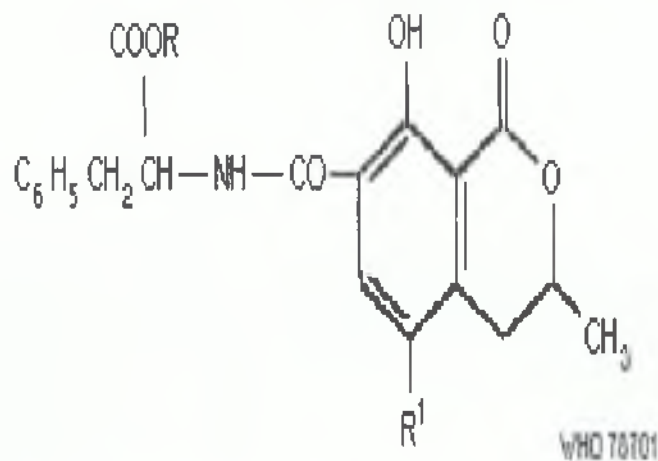


Fig. 6. The chemical structure of ochratoxins: ochratoxin A: $R' = Cl, R = H$; ochratoxin B: $R' = H, R = H$; ochratoxin C: $R = Cl, R' = C_2H_5$; methyl ester of ochratoxin A: $R = ^2Cl, R = CH_3$; methyl or ethyl ester of ochratoxin B: $R' = H, R = CH_3$ or C_2H_5 .

Σχήμα 2: Χημική Δομή της Ωχρατοξίνης Α

Οι κίνδυνοι τοξικότητας της OTA για την ανθρώπινη υγεία έχουν αξιολογηθεί σε ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο από την επιστημονική Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής των τροφίμων (SCF) και τη Μικτή FAO/WHO ειδική Επιτροπή των πρόσθετων ουσιών τροφίμων (JECFA), οι οποίες έχουν καθιερώσει τα ανεκτά όρια συγκέντρωσης της OTA στα τρόφιμα (SCF, 1998 JECFA, 2000).

Η Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων (Scientific Committee for Food) έθεσε σαν ανώτατο όριο πρόσληψης (tolerable daily Intake, TDI) OTA από τον άνθρωπο 5 ng/kg bw/day (ανά κιλό βάρους την ημέρα) και ο πλέον επαρκής τρόπος ανάλυσης για την OTA θεωρείται η χρωματογραφία υψηλής πίεσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC/MS) (Murphy et al, 2006).

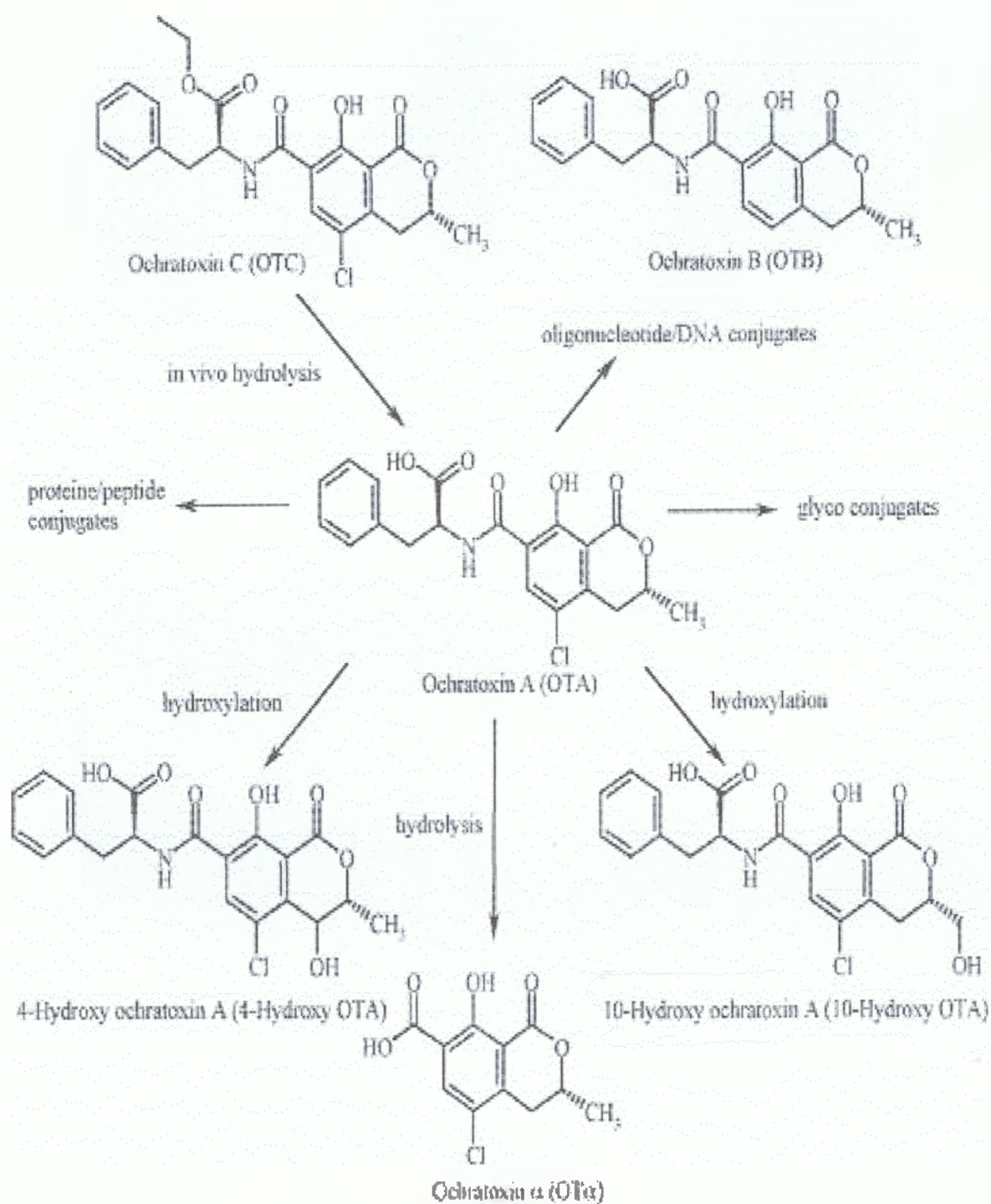
Αυτό που κάνει ιδιαίτερα μοναδική την Ωχρατοξίνη είναι η παρουσία του χλωρίου στη δομή της. Μελέτες έδειξαν ότι η ΟΤΑ παραμένει ιδιαίτερα σταθερή στην αύξηση της θερμοκρασίας, αλλά οξονόλυση της σε υδατικά της διαλύματα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη καταστροφή της.

1.2.2.1 ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΩΝ

Υπάρχουν τρία είδη ωχρατοξινών: Η Ωχρατοξίνη Α, Β, και C, τα οποία παράγονται από διάφορα γένη των *Aspergillus* και *Penicillium* μυκήτων (και ιδιαίτερα του μύκητα *Aspergillus ochraceus*) που αναπτύσσονται σε ημιτροπικά και θερμά κλίματα. Οι Ωχρατοξίνες είναι σχετικά σταθερές στη θερμότητα.

Χημικά, οι ωχρατοξίνες είναι ασθενή οργανικά οξέα που αποτελούνται από μια ομάδα διυδροϊσοκουμαρίνης (*dihydroisocoumarin*) που ενώνεται με πεπτιδικό δεσμό με μια L-Φαινυλαλανίνη. Δομικά, οι τρεις τοξίνες διαφέρουν ελαφρώς μεταξύ τους, εντούτοις, αυτές οι διαφορές έχουν μεγάλη σημασία στη τοξικότητα της κάθε μια από αυτές. Η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), είναι και η πιο συχνά απαντόμενη, αλλά και η πιο τοξική από τις τρεις. Όπως απεικονίζεται και στο σχήμα 3, αντικατάσταση του χλωρίου με ένα άτομο υδρογόνου μας δίνει την ωχρατοξίνη Β (ΟΤΒ), η οποία είναι κατά 10-20 φορές λιγότερο τοξική από την Α, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.

Περαιτέρω δομικές αλλαγές παράγουν την ωχρατοξίνη C (ΟΤC), η οποία δεν φαίνεται να έχει τοξική δράση. Εντούτοις, μια πρόσφατη δημοσίευση υποστηρίζει ότι η ΟΤC είναι πολύ πιο τοξική από την ΟΤΑ ή την ΟΤΒ στην κυτταρική σειρά THP-1 από ανθρώπινο μονοκύτταρο (μονοπύρηνο, φαγοκυτταρικό λευκοκύτταρο).



Σχήμα 3: Στάδια μετατροπής της Ωχρατοξίνης.

1.2.3 ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΗ

Αυτή η μυκοτοξίνη (*fumonisin*) παράγεται από τα παθογόνα στελέχη των μικροοργανισμών *Fusarium verticillioides* και *Fusarium proliferatum*, και σε πολύ μικρές ποσότητες, από τον μικροοργανισμό *Alternaria* στη ντομάτα, στο σπαράγγι και στο σκόρδο.

Οι Φουμονισίνες είναι ιδιαίτερα υδατοδιαλυτές, πολικές ενώσεις που είναι διαλυτές στο νερό και τα διαλύματα ύδατος της μεθανόλης και του ακετονιτριλίου, αλλά δεν είναι διαλυτοί στους μη πολικούς διαλύτες και σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες. Δεν περιέχουν αρωματικό δακτύλιο ή χρωμοφόρες περιοχές, ώστε να είναι εύκολη η ανίχνευσή τους.

Οι Φουμονισίνες παρουσιάζονται ιδιαίτερα σταθερές σε ένα πλήθος χημικών διαδικασιών και αλλαγών στη θερμοκρασία (Patricia et al, 2006). Είναι φυσικοί μολυσματικοί παράγοντες των σιταριών και των δημητριακών παγκοσμίως και βρίσκονται συνήθως στο καλαμπόκι και τα προϊόντα που παράγονται από αυτό. Προκαλούν σοβαρές διαταραχές στα ζώα, ενώ μελέτες απέδειξαν πως ευθύνονται για ασθένειες όπως το πνευμονικό οίδημα στους χοίρους καθώς επίσης και για τον καρκίνο του ήπατος και του οισοφάγου (Rheeder et al, 1992).

Τρόφιμα που περιέχουν αραβόσιτο, είναι τα πιο πιθανά να περιέχουν τοξίνες αυτής της οικογένειας και έτσι σε αυτά στρέφουν τη προσοχή τους οι βιομηχανίες τροφίμων. Υψηλά ποσοστά περιεκτικότητας σε Φουμονισίνες έχουν καταγραφεί σε μικρής έκτασης (οικιακές) καλλιέργειες καλαμποκιού τόσο στη Κίνα όσο και στη Νότια Αφρική.

Για τους λόγους αυτούς κρίθηκε αναγκαίο το FDA να θεσπίσει τα ανώτατα όρια του συνολικού περιεχομένου *fumonisin* στο καλαμπόκι (2-4 ppm) και σε τροφές (5-100 ppm) που βασίζονται σε αυτό. Έτσι η Ευρωπαϊκή Επιτροπή πρότεινε μια μέγιστη ανεκτή συνολική εισαγωγή *fumonisin* στον οργανισμό 2 g/kg σωματικού βάρους³.

Ειδικότερα ο τύπος *FumonisinB1* (FB1) προσελκύει την περισσότερη προσοχή δεδομένου ότι απαντώνται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70% της συνολικής περιεκτικότητας σε *fumonisin Fusarium* στα μολυσμένα δείγματα καλαμποκιού και

³ European Commission: Scientific Committee on Food, Updated opinion of the Scientific Committee, Fumonisin B1, B2 and B3, (2003)

εκθέτει τον άνθρωπο σε υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου προωθώντας τη δραστηριότητα όλων των *fumonisin*s. Το γεγονός αυτό συνδέθηκε με τον μεταβολισμό της μυκοτοξίνης κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των τροφίμων, που στηρίζεται κυρίως στη μερική ή πλήρη υδρόλυση της μίας ή και των δύο εστέρομάδων. Εκτός αυτού, η μερική υδρόλυση έχει παρατηρηθεί και παρουσία υγρασίας κάτω από τις υψηλές θερμοκρασίες.

Αυτή η αλυσίδα γεγονότων έθεσε το στάδιο ώστε να πολλαπλασιαστούν τα ερευνητικά προγράμματα ανά τον κόσμο, έχοντας ως στόχο τα ακόλουθα:

- 1) Τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των διαφόρων ειδών *fumonisin*s που μολύνουν τα τρόφιμα.
- 2) Τον καθορισμό των παραγόντων που ευνοούν τον σχηματισμό *fumonisin*
- 3) Τον έλεγχο μόλυνσης των τροφίμων και τον προσδιορισμό των επιτρεπτών ορίων στα τρόφιμα
- 4) Την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων για *fumonisin*s
- 5) Την κατανόηση της βιολογικής δραστηριότητας των *fumonisin*s στα ζώα και στους ανθρώπους.

1.2.4 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

Οι αφλατοξίνες παράγονται από διάφορα είδη *Aspergillus* και πιο συγκεκριμένα από *aspergillus flavus* και *aspergillus parasiticus* τα οποία πληθαίνουν στις γεωργικές καλλιέργειες κυρίως στις περιοχές με θερμό και υγρό κλίμα.

Μπορούν να μολύνουν πολλές σοδειές, συμπεριλαμβανομένων των φιστικιών, του καλαμποκιού, του βαμβακόσπορου, των καρυδιών της Βραζιλίας, των καρυκευμάτων, της *soyabean* (ξηρά καρύδα), και των σύκων. Η μόλυνση 'ευδοκιμεί' στις ζεστές και υγρές περιοχές του κόσμου, όπως η Αφρική και μερικά μέρη της Κίνας.

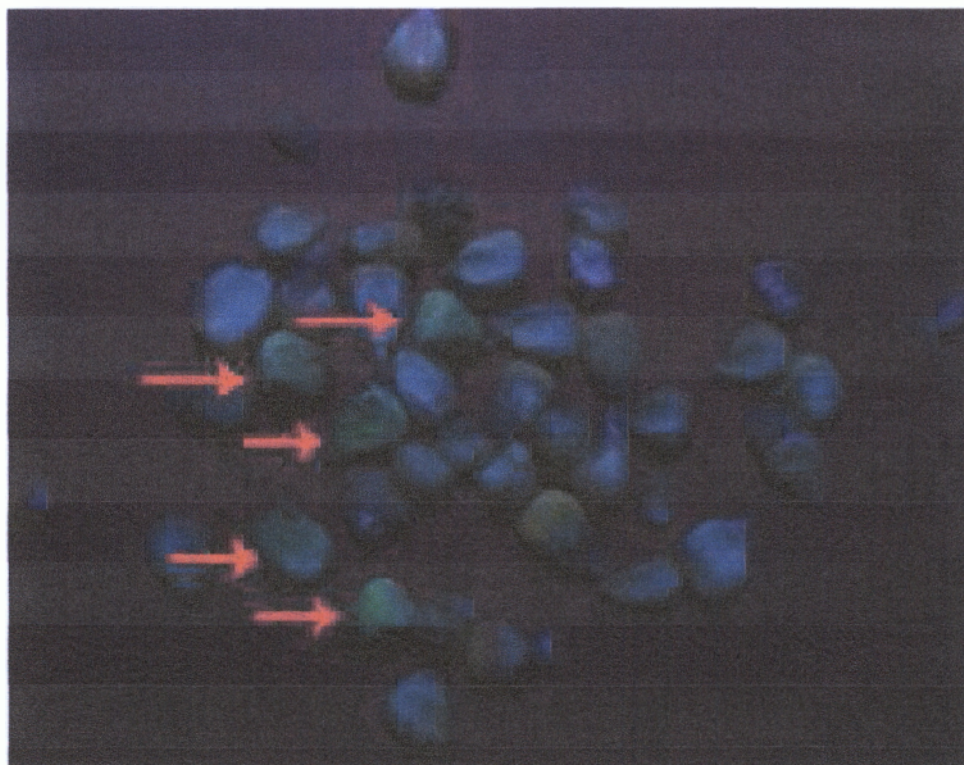
Είναι από τις πιο καρκινογόνες τοξίνες και μετά την εισαγωγή τους στον οργανισμό μεταβολίζονται στο συκώτι⁴. Αυτές οι μυκοτοξίνες απαντώνται σε διάφορες μορφές (13 τουλάχιστον) από τις οποίες οι πιο σημαντικές είναι οι: B1 (πιο καρκινογόνος από τις άλλες), B2, G1, G2, M1 και M2.

⁴ Διαθέσιμο on line: <http://en.wikipedia.org/wiki/mycotoxins>

Η Μ1 μορφή είναι ο κυρίαρχος μεταβολίτης της Αφλατοξίνης Β1 (AFB1) που βρίσκεται στο μητρικό γάλα που μεταβιβάζεται στο παιδί με το θηλασμό. Επίσης απαντάται και στα ζώα που καταναλώνουν AFB1-μολυσμένα τρόφιμα.

Το “B” και “G” πρόθεμα αναφέρεται στο μπλε (blue) ή πράσινο (green) φθορισμό που παρατηρείται ύστερα από έκθεση της τοξίνης σε U.V. ακτινοβολία (Βλ. Πίνακα 1 & Σχήμα 4).

Γνωρίζουμε ότι μερικές ενώσεις μετατρέπονται σε εξαιρετικά δραστικά μεταλλαξιγόνα δια μέσου της δράσης ενζύμων, τα οποία συνήθως παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση. Ένα εντυπωσιακό παράδειγμα αποτελεί και η Αφλατοξίνη Β1. Ένα ένζυμο κυτοχρώματος P450 μετατρέπει την ένωση αυτή σε ένα εξαιρετικά αντιδραστικό εποξείδιο. Ο παράγοντας αυτός αντιδρά με το άτομο N-7 της γουανίνης σχηματίζοντας μια ένωση η οποία συχνά οδηγεί σε μεταστροφή του ζεύγους βάσεων στο γενετικό υλικό από GC σε T-A (μετάλλαξη μετάπτωσης).



Σχήμα 4: Φθορισμός αφλατοξινών σε δείγματα από καλαμπόκι

Πίνακας 1: Είδη Αφλατοξινών και η προέλευσή τους

| ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ | ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ |
|-------------------|---|
| B1 & B2 | <i>Aspergillus flavus</i> & <i>A. parasiticus</i> |
| G1 & G2 | <i>Aspergillus parasitus</i> |
| M1 | Μεταβολίτης της B1 σε ζώα και ανθρώπους και σε μικρή ποσότητα σε μητρικό γάλα |
| M2 | Βρίσκεται στο γάλα βοειδών ύστερα από κατανάλωση μολυσμένης τροφής |

Η Διεθνής Επιτροπή αντικαρκινικού αγώνα έχει ταξινομήσει την αφλατοξίνη B1 (AFB1) ως καρκινογόνο ουσία και τις αφλατοξίνες B2, G1 και G2 (AFB2, AFG1 και AFG2) ως πιθανές καρκινογόνες ουσίες στους ανθρώπους. Στην πραγματικότητα, αποδείχθηκε ότι ανήκουν στις πιο ισχυρές νεφροτοξικές φυσικές ενώσεις και καρκινογόνες ουσίες που προσβάλλουν το συκώτι και συνεπώς, προσέλκυσε την ιδιαίτερη προσοχή προς μελέτη από την ανακάλυψή τους στις αρχές της δεκαετίας του '60'⁵.

Η επίδραση διάφορων φυσικών και χημικών παραγόντων στις αφλατοξίνες έχει εξετασθεί αρκετά, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι δυνατόν να απαλλαγθούν οι τροφές από αυτές με κάποια φυσική ή χημική διαδικασία. Συνοπτικά η επίδραση των παραγόντων αυτών έχει ως εξής (Εικόνα 1.1.):

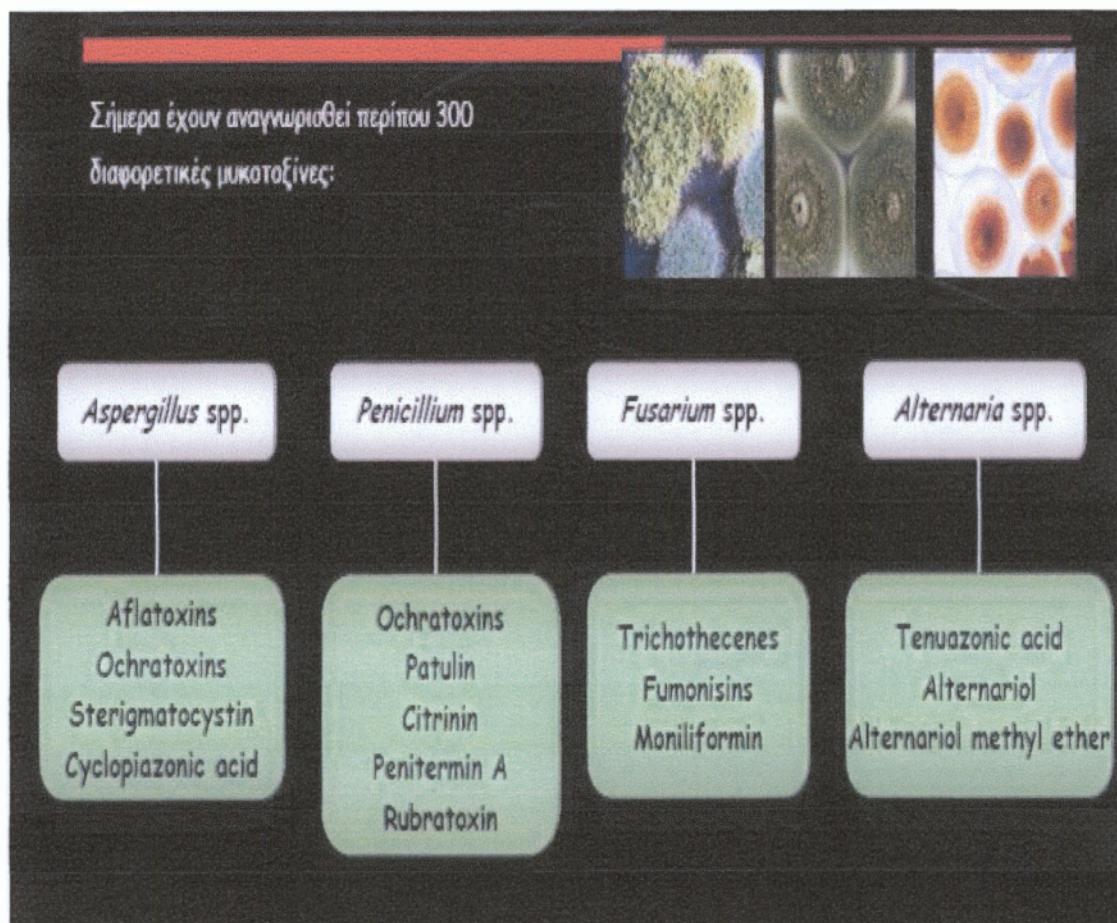
- **Θερμότητα:** Σε ξηρά κατάσταση είναι σταθερές μέχρι το σημείο τήξης τους. Αντιθέτως, παρουσία υγρασίας σε μικρό χρονικό διάστημα καταστρέφονται, κυρίως με υδρόλυση της λακτονικής ομάδας και στη συνέχεια με αποκαρβοξυλίωση.
- **Αλκάλια:** Καταστρέφουν τις αφλατοξίνες με υδρόλυση του λακτονικού δακτυλίου. Ωστόσο, φαίνεται ότι η υδρόλυση αυτή είναι αντιστρεπτή. Παρουσία οξέος επανασχηματίζεται ο λακτονικός δακτύλιος. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες τα αλκάλια αποσπούν τη μεθοξυλική ομάδα από τον αρωματικό δακτύλιο.

⁵ Commission Regulation (EC) No. 1525/98, amending Regulation (EC) No 184/97 setting maximum residue levels for certain contaminants in foodstuffs, Official J. Eur. Commun. L 201/43, 43, (1998)

□ **Οξέα:** Ισχυρά ανόργανα οξέα μετατρέπουν τις αφλατοξίνες B1 και G1 στις B2a και G2a αντίστοιχα, με προσθήκη νερού στο διπλό δεσμό του ακραίου φουρανικού δακτυλίου.

□ **Οξειδωτικά μέσα:** Οξειδωτικά μέσα όπως υποχλωριώδες νάτριο, υπερμαγγανικό κάλιο, χλώριο, υπεροξείδιο του υδρογόνου, υπερβορικό νάτριο φαίνεται ότι αλλοιώνουν τα μόρια, γεγονός που αποδεικνύεται από τον εξαφανισμό του χαρακτηριστικού φθορισμού τους.

□ **Αναγωγικά μέσα:** Με υδρογόνωση οι αφλατοξίνες B1 και G1 μετατρέπονται στις αφλατοξίνες B2 και G2, αντίστοιχα. Με ισχυρότερα αναγωγικά μέσα, όπως το τετραϋδροβορικό νάτριο (NaBH₄) ανάγεται η κετονική ομάδα του κυκλοπεντενικού δακτυλίου των αφλατοξινών B1 και B2 (προς -CH₂-) παρέχοντας τις αφλατοξίνες RB1 και RB2 (Reduced B1, B2) (SCF, 1998).



Εικόνα 1.1: Μυκοτοξικογόνοι μύκητες και μυκοτοξίνες

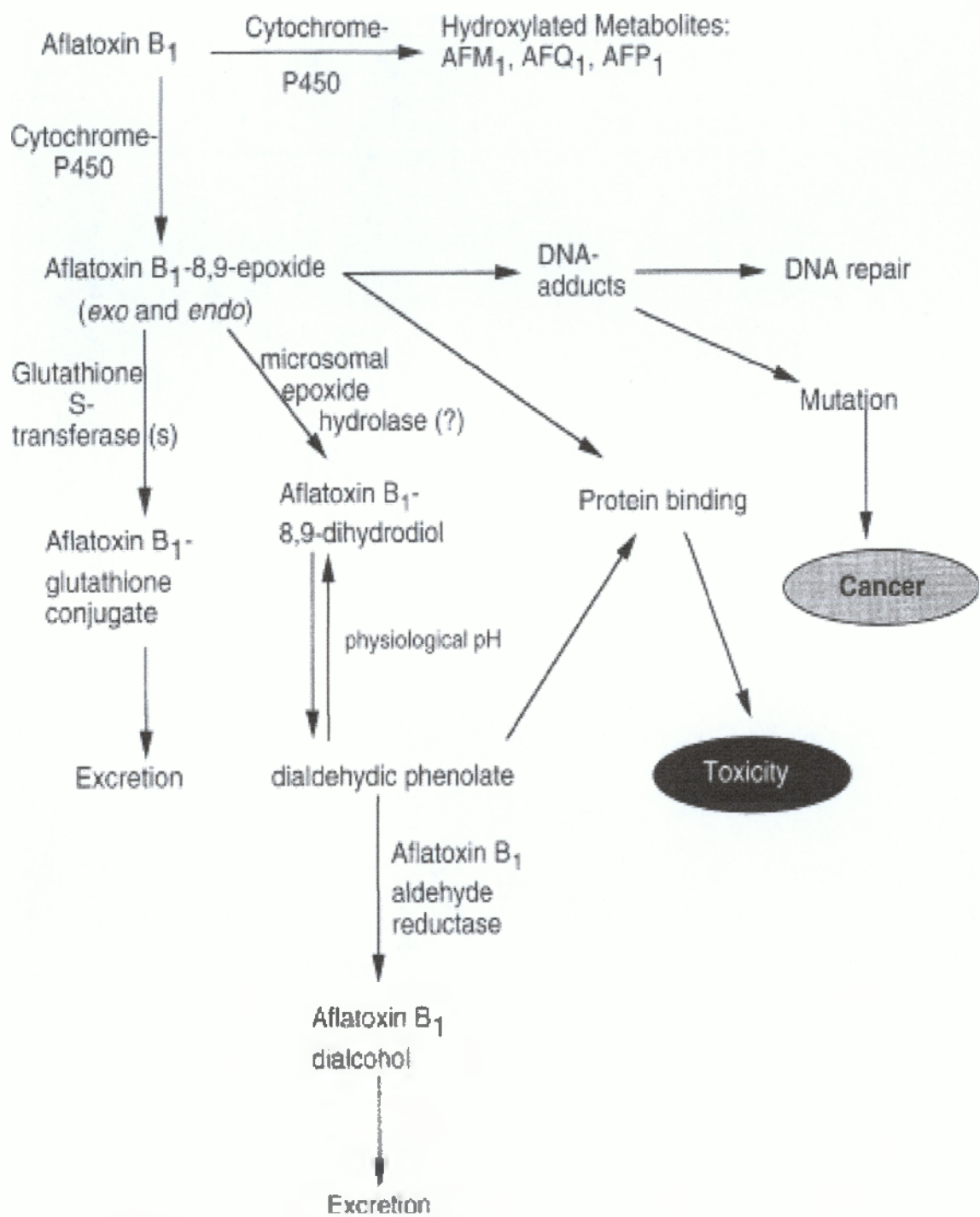
Παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή μυκοτοξινών από τους μύκητες είναι οι εξής:

1. Θερμοκρασία (7,5 - 40°C)
2. Υγρασία (> 80%)
3. Φως (μεγαλύτερη παραγωγή σε απουσία φωτός)
4. pH (ιδανικό 4 - 4,6)
5. Υπόστρωμα (ευνοϊκό υπόστρωμα είναι τα προϊόντα φυτικής προέλευσης)
6. Παρουσία μυκοστατικών (NaCl, σορβικό οξύ, καφεΐνη, θεοφυλλίνη, κ.ά.)

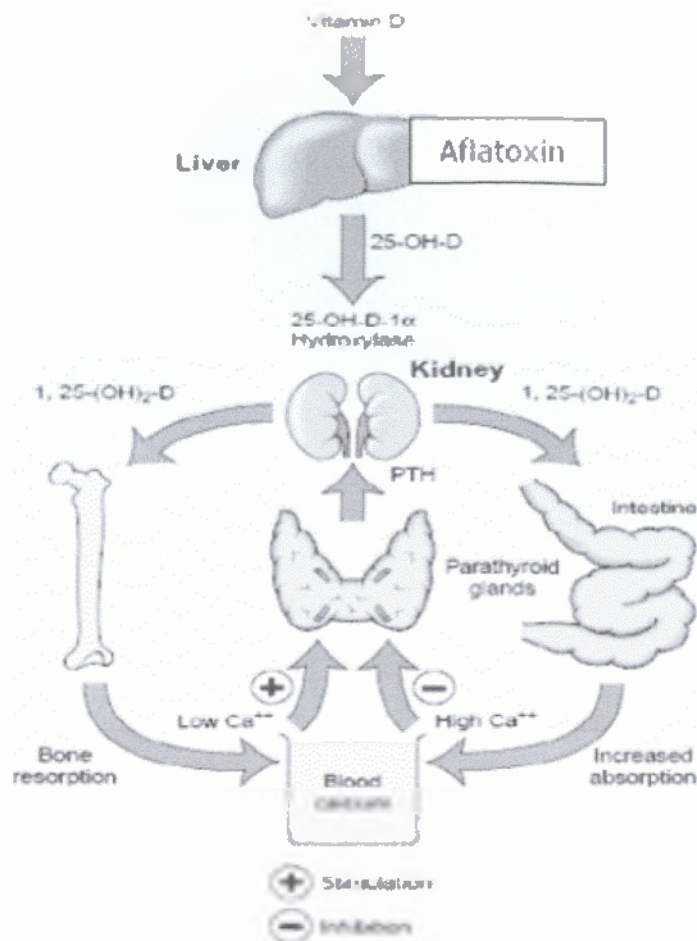
Συνοπτικά, ο μηχανισμός της τοξικής δράσης των αφλατοξινών έχει ως εξής: Οι αφλατοξίνες στον οργανισμό με την επίδραση των ενζύμων της ομάδας του κυτοχρώματος P450 μεταβολίζονται στο ήπαρ προς διάφορα παραπροϊόντα, μεταξύ των οποίων βρίσκεται και μία εποξειδική ένωση. Ο μεταβολίτης αυτός σχηματίζει ένωση προσθήκης με τη γουανίνη του DNA και του RNA, γεγονός που οδηγεί σε αποπουρίνωση και θραύση της αλυσίδας των νουκλεϊνικών οξέων, με τελικό αποτέλεσμα τη διακοπή της σύνθεσης απαραίτητων πρωτεϊνών σε ιστούς ζωτικών οργάνων, όπως στο ήπαρ, στα έντερα και στο μυελό των οστών.

Λόγω της μεταφοράς τους στα τρόφιμα, και συνεπώς και στον οργανισμό μέσω της τροφικής αλυσίδας, θεωρούνται ότι μπορούν να επηρεάσουν σε μεγαλύτερο βαθμό από όλες τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες την ανθρώπινη υγεία.

Περιοχές με υψηλά ποσοστά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) σύμφωνα με μια έρευνα έχουν να κάνουν όχι μόνο με την ηπατίτιδα β αλλά και με ταυτόχρονη μόλυνση από AFB1, πράγμα που δείχνει ότι η AFB1 είναι ικανός παράγοντας για να προκαλέσει από μόνος του HCC στον άνθρωπο (Βλ. Σχήμα 5 & 6) (Patricia et all. 2006).



Σχήμα 5: Ο μεταβολισμός της αφλατοξίνης B₁ (Murphy et al, 2006)



Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου μόλυνσης του ανθρώπινου οργανισμού από αφλατοξίνες

Πιο πρόσφατο παράδειγμα προσβολής πληθυσμού από αφλατοξίνη είναι αυτό στην ανατολική Κένυα, όπου το 2004 προσβλήθηκαν κάποιες εκατοντάδες πληθυσμού. Ο λόγος αυτού του ξαφνικού ξεσπάσματος ήταν η φτωχή συγκομιδή αραβοσίτου όπου είχε «χαλάσει» και ήταν ευάλωτη στη μούχλα λόγω της ξηρασίας. Επιπλέον οι άνθρωποι, για να φρουρήσουν τη σοδειά τους ενάντια στην κλοπή, αποθήκευσαν τον αραβόσιτο στα σπίτια τους, τα οποία ήταν θερμότερα και πιο υγρά από τους σιτοβολώνες όπου αποθηκευόταν συνήθως. Από τον Ιανουάριο μέχρι τον Ιούνιο του 2004, 317 άνθρωποι εισήχθησαν σε νοσοκομεία για νοσοκομειακή περίθαλψη, με συμπτώματα ηπατικής ανεπάρκειας, εκ των οποίων 125 πέθαναν. Όταν εξετάστηκαν τα δείγματα αραβοσίτου βρέθηκαν συγκεντρώσεις αφλατοξίνης Β1 υψηλότερες μέχρι και 4400 μέρη ανά δισεκατομμύριο (ppb), δηλαδή 220 φορές πάνω από το κενυατικό όριο για τα τρόφιμα (Belli et al., 2002).

Εκτός του καρκίνου του ήπατος, έκθεση σε μεγάλα ποσοστά αφλατοξίνης μπορεί να οδηγήσει σε οξεία ζημιά του συκωτιού, οίδημα, αλλαγή στην πέψη και στην απορρόφηση ή/και στο μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών. Κανένα ζωικό είδος δεν είναι άνοσο στα τοξικά αποτελέσματα των αφλατοξινών, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων, εντούτοις, οι άνθρωποι έχουν μια εξαιρετικά υψηλή ανοχή στην έκθεση αφλατοξίνης. Τα παιδιά, παρόλα αυτά, επηρεάζονται ιδιαίτερα από την αφλατοξίνη που οδηγεί σε καθυστέρηση στην ανάπτυξη και σε νοητική στέρηση. Ο μεταβολίτης M1 της αφλατοξίνης μπορεί να παρεμβληθεί στο DNA και να αλκυλοποιήσει τις βάσεις του, προκαλώντας καρκίνο του ήπατος.

ΙΑτρικές έρευνες έχουν αποδείξει, ότι μια κανονική διατροφή συμπεριλαμβανομένων λαχανικών όπως τα καρότα, το σέλινο και ο μαϊντανός, μειώνει τα καρκινογόνα αποτελέσματα της αφλατοξίνης⁶.

1.2.5 ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ

Η Ζεαραλενόνη (*zearalenone*, *ZON*) (σχήμα 7), ανήκει στην κατηγορία των μυκοοιστρογόνων, και έχει προκαλέσει την έντονη προσοχή της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της πιθανότητας να επηρεάζει τα περιβαλλοντικά οιστρογόνα, τα οποία μπορεί να έχουν τη δυνατότητα να αναστατώνουν τις λειτουργίες των στεροειδών ορμονών που καθορίζουν το φύλο. Πρόκειται για προϊόν δευτερογενούς μεταβολισμού.

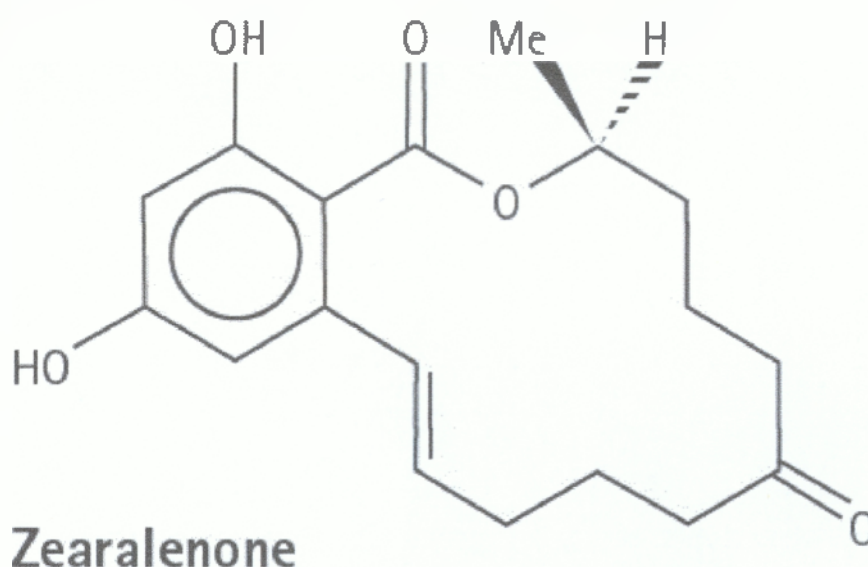
1.2.5.1 ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ

Η ζεαραλενόνη είναι μια λακτόνη του 6 (10-υδροξύ-6-όξο-τρανς-1-εντενέκυλο)-β-ρεσορκυκλικού οξέος με μοριακό τύπο C₁₈H₂₂O₅ και μοριακό βάρος 318,36. Οι μεταβολίτες α- και β-ZEN είναι τα δύο ισομερή που σχηματίζονται με την αναγωγή της κετονο-ομάδας του άνθρακα στη θέση 6 του δακτυλίου της λακτόνης, σε υδροξυλ-ομάδα (C=O→C-OH) και έχουν μοριακό τύπο C₁₈H₂₄O₅, και μοριακό βάρος 320,36 (JECFA, 2000).

⁶ Διαθέσιμο on line: <http://en.wikipedia.org/wiki/mycotoxins>

1.2.5.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗΣ

Η Ζεαραλενόνη είναι ένα άσπρο κρυσταλλικό στερεό με το σημείο τήξης της να κυμαίνεται από 159-165 OC, ενώ το μοριακό της βάρος είναι 318,36. Η διαλυτότητα της στο νερό είναι 0,002g/100ml. Είναι λιγότερο διαλυτή στο εξάνιο και παρουσιάζει σταδιακή αύξηση στο βενζόλιο, το ακετονιτρίλιο, τη μεθανόλη, την αιθανόλη και την ακετόνη. Είναι επίσης διαλυτή στα υδάτινα αλκαλικά διαλύματα.



Σχήμα 7: Συντακτικός τύπος της ζεαραλενόνης

1.2.5.3 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η μέση θανατηφόρος δόση LD50 (median lethal dose) της ZON ορίζεται μεταξύ 4.000 και 20.000 mg/kg σωματικού βάρους (JECFA, 2000). Για τη διερεύνηση της τοξικότητας της ZON για πρόκληση οξείας παθολογικής κατάστασης, έγιναν διάφοροι πειραματισμοί κυρίως σε τρωκτικά. Η χορήγηση ZON, με την τροφή, σε επίμνες, σε δόση 0, 0,1, 1,0, ή 3,0 mg/kg Σ.Β., ανά ημέρα, για 104 εβδομάδες προκάλεσε σημαντική αύξηση του βάρους του ήπατος σε όλα τα πειραματόζωα.

Η μελέτη κι η εκτίμηση των πειραματικών δεδομένων οδήγησε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στον καθορισμό ενός προσωρινού ορίου ανεκτής ημερήσιας πρόσληψης ZON ίσο με 0,5 μg/kg Σ.Β.

1.2.5.4 ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Η ζεαραλενόνη απαντάται (παγκοσμίως) στους δημητριακούς καρπούς (σιτάρι, κριθάρι, σόγια, βρώμη, καλαμπόκι, κ.λπ.), όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας κατά την αποθήκευσή τους ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων. Οι μύκητες του γένους *Fusarium* παράγουν τα υψηλότερα ποσοστά ZON σε σχετική υγρασία 45% και θερμοκρασία 20-25°C.

1.2.5.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗΣ ΣΤΙΣ ΣΥΓΚΟΜΙΔΕΣ

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η μόλυνση των τροφίμων από τους μύκητες οφείλεται στο σύνολο τριών κυρίως παραγόντων:

- _ Στην μόλυνση των εγκαταστάσεων με έναν μυκητιακό εμβόλιο
- _ Στην αύξηση εκείνων των μυκήτων
- _ Στην ενδεχόμενη παραγωγή της μυκοτοξίνης.

Οι κύριοι μηχανισμοί της μόλυνσης περιλαμβάνουν τη διασπορά του μολυσματικού υλικού από το χώμα και τη βροχή κατά τη διάρκεια της άνθησης (σίτος και κριθάρι) ή (αραβόσιτος), μαζί με τη μεταφορά του μολυσματικού υλικού από τον αέρα. Έτσι εμποδίζεται να αναπτυχθεί η συγκομιδή αραβόσιτου. Επιπλέον η μεταφορά του μολυσματικού υλικού στον αραβόσιτο μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε από τα πουλιά είτε από τα έντομα, γεγονός που οδηγεί στη μετάδοση των μυκήτων του γένους *graminearum F.*

1.2.5.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Ο μεταβολισμός της Ζεαραλενόνης έχει ιδιαίτερη σημασία και αποτελεί αντικείμενο μελέτης περισσότερο από οποιαδήποτε άλλης μυκοτοξίνης, δεδομένου ότι μερικοί από τους μεταβολίτες υπερβαίνουν αρκετά τις επιδράσεις που προκαλεί η ZON. Μάλιστα κάποιος από αυτούς έχουν υιοθετηθεί ευρέως σαν τονωτικό από το 1969 προκειμένου να επιτευχθεί η βελτίωση των ποσοστών αύξησης βάρους των βοοειδών. Λόγω των ανησυχιών για τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία τόσο

των ζώων όσο και στους ανθρώπους, η χρήση τους καθώς επίσης και η παρουσία τους στα τρόφιμα έχουν απαγορευθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 1985⁷.

Οι κύριοι μεταβολίτες της ζεαραλενόλης είναι η α- και η β-ζεαραλενόλη (α-ZEN και β-ZEN). Δευτερευόντως ανιχνεύονται η α-ζεαραλανόλη (ζερανόλη) και η β-ζεαραλανόλη (ταλερανόλη). Γενικά οι μεταβολίτες της ZON δημιουργούν χημικές ενώσεις με το γλυκουρονικό οξύ, όμως στα διάφορα είδη ζώων έχουν διαπιστωθεί ορισμένες διαφορές ως προς το μεταβολισμό της.

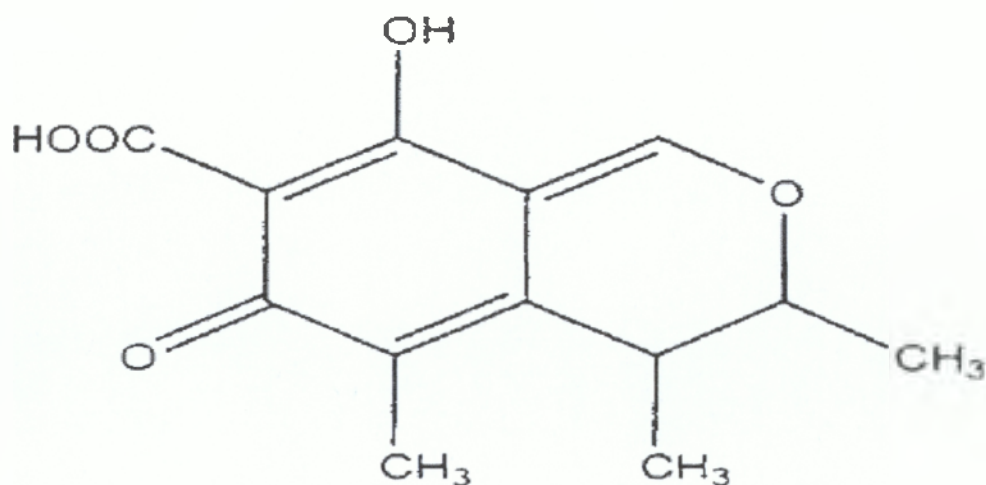
Η ZON μεταβολίζεται από το ήπαρ ακολουθώντας δύο κύριες οδούς. Η πρώτη οδός είναι η δημιουργία ενώσεων με το γλυκουρονικό οξύ και η δεύτερη η μετατροπή της με υδροξυλίωση (*hydroxylation*) σε α- και β- ισομερή ζεαραλενόλης. Όπως προαναφέρθηκε και οι μεταβολίτες της ZON (α- και β-ZEN) σχηματίζουν ενώσεις με το γλυκουρονικό οξύ. Η δημιουργία γλυκουρονικών ενώσεων καταλύεται από τις UDPGT-τρανσφεράσες, ενώ ο μεταβολισμός της ZON μέσω της δεύτερης οδού καταλύεται πιθανώς από τα ένζυμα 3α- και 3β-υδροξυστεροειδή δευδρογονάση (3α-HSD και 3β-HSD). Τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται φυσιολογικά στο μεταβολισμό και στη βιοσύνθεση των στεροειδών στο ήπαρ και καταλύουν την μετατροπή της 5α-ανδροστεν- 3,17-διόνης σε ανδροστερόνη. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι η παρατεταμένη πρόσληψη ZON μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή του μεταβολισμού των στεροειδών. Στο χοίρο έχει αποδειχθεί ότι για το μεταβολισμό της ζεαραλενόλης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η χολή και η εντεροηπατική κυκλοφορία. Η ZON απεκκρίνεται με τη χολή με τη μορφή γλυκουρονικών μεταβολιτών. Στη συνέχεια απορροφάται εκ νέου και μεταβολίζεται περαιτέρω από τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου και επιστρέφει, διαμέσου της πυλαίας κυκλοφορίας στο ήπαρ και στη συστηματική κυκλοφορία. Ο κύκλος αυτός έχει ως συνέπεια την ανίχνευση αυξημένων συγκεντρώσεων των μεταβολιτών της ZON στο πλάσμα του αίματος και αιτιολογεί τον αυξημένο χρόνο ημίσειας ζωής τους στο χοίρο. Ο κύκλος που περιγράφεται παραπάνω έχει αποδειχθεί πειραματικά σε άνηβες σύες στις οποίες χορηγήθηκε ραδιοσημασμένη ZON, εφάπαξ, IV (5 mg/kg Σ.Β.) ή PO (10 mg/kg Σ.Β.). Ο χρόνος ημίσειας ζωής ήταν 86 ώρες και 36 λεπτά, ενώ όταν απομακρύνθηκε η χολή με τη βοήθεια καθετήρα ο αντίστοιχος χρόνος μειώθηκε στις 3 ώρες και 18 λεπτά επιβεβαιώνοντας έτσι τον εντεροηπατικό μεταβολικό κύκλο.

⁷ Council Directive 85/649/EEC, (1985)

Στους χοίρους το 67% της χορηγούμενης από το στόμα δόσης ανιχνεύεται στο ούρο και στα κόπρανα εντός 48 ωρών, σε αναλογία 45% και 22%, αντίστοιχα.

1.2.6 ΚΙΤΡΙΝΙΝΗ

Η κιτρινίνη (σχήμα 8) απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον μύκητα *Penicillium citrinum*, πριν από το δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο. Ακολούθησε η ανακάλυψή της σε μία σειρά ειδών *Penicillium* (όπως *Penicillium camemberti*) και *Aspergillus* (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus niveus* και *Aspergillus oryzae*). Πρόσφατα, η κιτρινίνη απομονώθηκε και από τους μύκητες *Monascus ruber* και *Monascus purpureus*, είδη τα οποία χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την παραγωγή κόκκινης χρωστικής (Manabe, 2001).



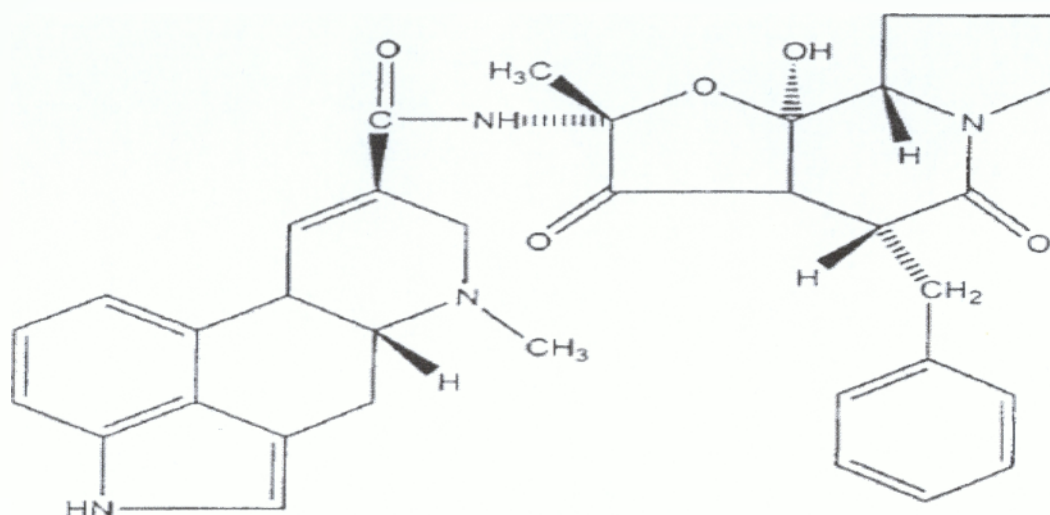
Σχήμα 8. Χημική δομή της κιτρινίνης

Η κιτρινίνη περιέχεται στο σιτάρι, στη βρώμη, στη σίκαλη, στο καλαμπόκι, στο κριθάρι και στο ρύζι. Με τη βοήθεια ανοσοτεχνικών μεθόδων είναι δυνατή η ανίχνευσή της ακόμη και σε μικροποσότητες σε όλα τα παραπάνω προϊόντα. Παρ' όλο που η κιτρινίνη έχει συσχετιστεί άμεσα με τα τρόφιμα, η επίδρασή της στην ανθρώπινη υγεία δεν έχει απολύτως διευκρινιστεί ακόμη.

1.2.7 ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ERGOT

Τα αλκαλοειδή του ergot ή εργοτοαλκαλοειδή συγκαταλέγονται μεταξύ των σπουδαιότερων μεταβολιτών των μυκήτων (σχήμα 9). Κατηγοριοποιούνται σε: (α)

ινδολο-αλκαλοειδή και (β) παράγωγα του τετρακυκλικού δακτυλίου του ergot. Το λυσεργικό οξύ, η κοινή δομή όλων των εργοτοαλκαλοειδών, απομονώθηκε το 1934. Κύριος εκπρόσωπος της οικογένειας είναι η εργοταμίνη (Bennett et all, 1999).



Σχήμα 9. Χημική δομή της εργοταμίνης.

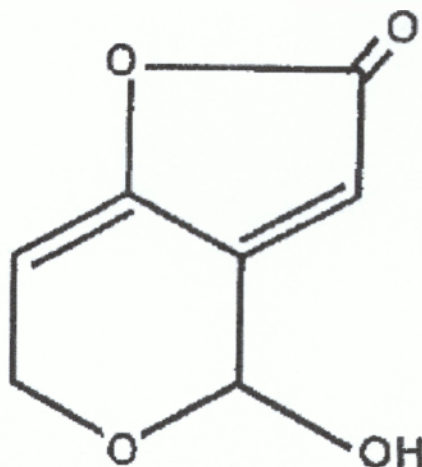
Οι ενώσεις της κατηγορίας αυτής συγκροτούν ένα τοξικό κοκτέιλ, το οποίο παράγεται από μύκητες του γένους *Claviceps*. Η τοξικότητα των εργοτοαλκαλοειδών, άλλωστε, είχε αναφερθεί από την αρχαιότητα (600 π.Χ.). Ο άνθρωπος ασθενεί όταν καταναλώσει δημητριακά, τα οποία έχουν μολυνθεί από μύκητες που εκκρίνουν εργοτοαλκαλοειδή, συνήθως υπό μορφή ψωμιού. Η συγκεκριμένη κατάσταση (νόσος) ονομάστηκε εργοτισμός. Δύο είδη εργοτισμού είναι χαρακτηριστικά: ο γαγγραινώδης και ο σπασμωδικός. Στη γαγγραινώδη μορφή της νόσου χαρακτηριστικό φαινόμενο είναι η διακοπή της παροχής των αρτηριών των κάτω άκρων με αίμα, ενώ όσον αφορά στη δεύτερη μορφή, η προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος (Bennett et all, 1999).

Ο εργοτισμός αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα στην κτηνιατρική. Τα ζώα που βρίσκονται σε άμεσο κίνδυνο είναι οι αγελάδες, τα πρόβατα, οι χοίροι και τα κοτόπουλα, με κύρια κλινικά συμπτώματα: γάγγραινα, τις αποβολές, έντονους σπασμούς, διακοπή του γάλακτος, υπερευαισθησία και αταξία. Άλλωστε είναι γνωστό από τη λαϊκή παράδοση ότι εδώ και αιώνες οι μαιές των ζώων έχουν υιοθετήσει το ergot ως φάρμακο για τις αμβλώσεις, αφού είχε παρατηρηθεί ότι η βοσκή γρασιδιού μολυσμένου με εργοτοαλκαλοειδή προκαλεί αποβολές.

Γενικά, τα παράγωγα του ergot παρουσιάζουν μία πληθώρα δράσεων, οι οποίες καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών. Πρόσφατα, η εργοταμίνη χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο για την ημικρανία. Άλλα παράγωγα χρησιμοποιούνται ως αναστολείς της προλακτίνης, ως αντιπαρκινσονικά και ως φάρμακα για τη θεραπεία αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων. Παρ' όλ' αυτά, η χορήγησή τους είναι πολύ πιθανό να προκαλέσει εργοτισμό, ακόμη και σε φαρμακολογικά θεραπευτικές δόσεις (Bennett et all, 1999).

1.2.8 ΠΑΤΟΥΛΙΝΗ

Η πατουλίνη [4-υδρόξυ-4H-φουρο(3, 2c) πυρανο-2(6H)-όνη] παράγεται από πολλά είδη μυκήτων, (σχήμα 10) αλλά πρωτοαπομονώθηκε ως αντιβιοτικό στη δεκαετία του '40 από τον μύκητα *Penicillium griseofulvum*. Ο ίδιος μεταβολίτης απομονώθηκε και από άλλα είδη, όπου του δόθηκαν διάφορα ονόματα όπως κλαβασίνη, κλαβιφορμίνη, εξπανσίνη, μυκοΐνη c και πενισιδίνη.



Σχήμα 10. Χημική δομή της πατουλίνης.

Εκτός από την αντιμικροβιακή και την αντιπρωτοζωϊκή της δράση, η πατουλίνη παρουσιάζει τοξικότητα τόσο στα ζώα όσο και στα φυτά. Στα τελευταία προκαλεί έντονη αποσύνθεση (σάπισμα), κυρίως στα μήλα, στα αχλάδια και στα κεράσια.

Παρ' όλο που η πατουλίνη είναι τοξική σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σε εργαστηριακό επίπεδο, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας όρισε ως ανώτατο όριο της για τον ανθρώπινο οργανισμό τα 0.4 mg/Kg/d.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Η ανίχνευση των μυκοτοξινών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον λαμβάνοντας υπόψη τις συνέπειες που επιφέρουν στην υγεία ανθρώπων και ζώων η ύπαρξή τους στα τρόφιμα ή τις ζωοτροφές. Όταν οι έλεγχοι διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των προϊόντων με τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια είναι ζωτικής σημασίας το τελικό αναλυτικό αποτέλεσμα να εκφράζει την πραγματική τιμή ώστε οι μέθοδοι ανάλυσης να είναι ακριβής, αξιόπιστες και επικυρωμένες.

Εάν δεν επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο είναι δυνατό πολλά προϊόντα να απορρίπτονται χωρίς λόγο ή αντίστροφα, προβληματικές παρτίδες να γίνονται αποδεκτές δημιουργώντας κινδύνους στην υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών, καθώς επίσης και σοβαρές επιπτώσεις στην οικονομία και το παγκόσμιο εμπόριο. Νομοθετικά (Καν. 882/2004 Παρ.3), στις γενικές απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τροφίμων αναφέρεται ότι οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα κριτήρια: α) ορθότητα, β) ευκολία εφαρμογής, γ) όριο ανίχνευσης, δ) όριο προσδιορισμού, ε) ακρίβεια (λαμβάνεται από διεργαστηριακή δοκιμή), στ) επαναληψιμότητα, ζ) αναπαραγωγιμότητα, η) ανάκτηση, θ) επιλεκτικότητα, ι) ευαισθησία, ια) γραμμικότητα, ιβ) αβεβαιότητα.

Είναι επίσης αναγκαίο τα εργαστήρια να χρησιμοποιούν μεθόδους με ποσοστά απόδοσης όπως απαιτούνται από τη νομοθεσία (Καν 401/2006). Πριν από την ανάλυση των τροφίμων για τον έλεγχο της ύπαρξης μυκοτοξινών προηγούνται μία σειρά πολλών και σύνθετων λειτουργιών, στις οποίες περιλαμβάνονται: η δειγματοληψία, η προετοιμασία του δείγματος, η εκχύλιση των μυκοτοξινών από το δείγμα, ο καθαρισμός του δείγματος και τέλος ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός, με διάφορες μεθόδους.

Η **δειγματοληψία** αφορά την επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από το σύνολο της παρτίδας, στο οποίο θα γίνει και η ανάλυση. Η δειγματοληψία είναι το πιο σημαντικό στοιχείο της ανάλυσης δεδομένου ότι οι μυκοτοξίνες είναι ανομοιόμορφα κατανεμημένες στα τρόφιμα.

Η προετοιμασία αποσκοπεί στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των τροφίμων έτσι ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια, να υπάρχει καλύτερη εκχύλιση από τον διαλύτη. Η άλεση του δείγματος και η δημιουργία μικρών σωματιδίων ομογενοποιεί το δείγμα, στάδιο το οποίο αν και χρονοβόρο είναι απολύτως απαραίτητο και βασικό στην ανάλυση.

Η εκχύλιση είναι ένα σημαντικό στάδιο στον προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα διάφορα υποστρώματα ή τρόφιμα. Λόγω της διαφορετικής φύσης των προϊόντων που είναι δυνατό να μολυνθούν από μυκοτοξίνες, δεν υπάρχει μία μοναδική μέθοδος κατάλληλη για όλα τα προϊόντα. Η εκχύλιση υγρού-στερεού είναι μία από τις συνήθεις διαδικασίες στην ανάλυση μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα. Η εκχύλιση, κατά ένα μεγάλο μέρος εξαρτάται από τις φυσικο-χημικές ιδιότητες των υλικών που έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες και ουσιαστικά βασίζεται στη διαλυτότητα των μυκοτοξινών σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες.

Για την εκχύλιση, χρησιμοποιούνται συνήθως οργανικοί διαλύτες ή μίγματά τους όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο ή μεθανόλη, λόγω του ότι οι μυκοτοξίνες είναι διαλυτές σε μετρίως ή ελαφρώς πολικούς διαλύτες. Επίσης, η χρήση μικρών ποσοτήτων νερού σε συνδυασμό με τους προαναφερόμενους διαλύτες υγραίνει το υπόστρωμα αυξάνοντας έτσι τη διείσδυση των οργανικών διαλυτών στο δείγμα άρα βελτιώνει την εκχύλιση της μυκοτοξίνης. Οι πιο συνήθεις διαλύτες για την εκχύλιση μυκοτοξινών σε διάφορα τρόφιμα είναι μίγματα χλωροφορμίου-νερού, μεθανόλης-νερού, μεθανόλης-ακετονιτριλίου- νερού και ακετονιτριλίου νερού. Ο διαλύτης μεθανόλη- νερό έχει το πλεονέκτημα ότι είναι λιγότερο τοξικός σε σχέση με τα μίγματα ακετονιτριλίου

Οι περισσότερες μέθοδοι που κυρίως χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μυκοτοξινών βασίζονται συνήθως σε μία διαδικασία καθαρισμού, ο οποίος πραγματοποιείται μετά την εκχύλιση.

2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Οι περισσότερες μυκοτοξίνες είναι χημικά σταθερά μόρια και για το λόγο αυτό έχουν την τάση να επιβιώνουν κατά την αποθήκευση και την επεξεργασία ακόμη και μετά από μαγείρεμα σε χαμηλή θερμοκρασία (ψωμί και παραγωγή δημητριακών για πρωινό).

Οι μυκοτοξίνες είναι δύσκολο να απομακρυνθούν και η καλύτερη μέθοδος ελέγχου είναι η αναστολή τους. Η παρουσία ενός αναγνωρισμένου μύκητα που παράγει τοξίνες, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι θα παραχθούν οι τοξίνες διότι εμπλέκονται πολλοί παράγοντες για το σχηματισμό τους. Αντίστοιχα, η απουσία κάθε ορατής μούχλας δεν εγγυάται και την απουσία τοξινών. Οι μύκητες γενικά αναπτύσσονται σε κοιλότητες και δεν διανέμονται εξίσου στα αποθηκευμένα αγαθά. Επομένως, είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός πρωτοκόλλου το οποίο θα διαβεβαιώνει ότι όταν ένα δείγμα λαμβάνεται για ανάλυση θα είναι αντιπροσωπευτικό ολόκληρης της μόλυνσης. Από τη στιγμή που οι μυκοτοξίνες δεν διανέμονται εξίσου στους κόκκους και στις ανάμικτες τροφές, η λήψη ενός τέτοιου δείγματος για την ανάλυση της μυκοτοξίνης είναι αρκετά δύσκολη. Το γεγονός ότι οι μυκοτοξίνες είναι τοξικές σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις απαιτεί ευαίσθητες και αξιόπιστες μεθόδους για την ανίχνευσή τους. Η δειγματοληψία και η ανάλυση είναι ζωτικής σημασίας αφού η αποτυχία της επίτευξης μια ικανοποιητικής επικυρωμένης ανάλυσης οδηγεί σε λανθασμένη αποδοχή ή απόρριψη προϊόντων με σοβαρές συνέπειες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης, εξαιτίας των διαφορετικών δομών δεν υπάρχει μόνο μία τεχνική για την ανίχνευση όλων των μυκοτοξινών, αλλά αναπτύσσεται διαφορετική τεχνική ανάλογα με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες.

Ιδανική θα ήταν η ύπαρξη απλών μεθόδων που δεν θα χρειαζόταν επιστημονικό προσωπικό και που θα ήταν απλές και οικονομικές.

Η εφαρμογή απλούστερων, φθηνότερων και αποτελεσματικών μεθόδων για την ανίχνευση των μυκοτοξινών είναι απαραίτητη για τη νομοθεσία των μέγιστων ορίων ποσότητας στα τρόφιμα.

Μια επιτυχημένη μέθοδος ανίχνευσης πρέπει να είναι ευαίσθητη, να έχει υψηλό βαθμό ευελιξίας σε ένα μεγάλο εύρος μεταβολιτών, αλλά και να είναι πολύ εξειδικευμένη όταν χρειάζεται.

Για εργασία στο πεδίο, η μέθοδος πρέπει να είναι ταχεία και φορητή.

Παρακάτω θα προσδιορίσουμε διάφορα είδη μυκοτοξινών σε τρόφιμα, όπως τα είχαμε προσδιορίσει στο εργαστήριο:

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΕΣ

25gr δείγματος

+

125ml Acetonitrile/Methanol/H₂O (25:25:50)+25gr NaCl S15

↓
Blending 3min
↓
διήθηση με ηθμούς Watman
↓
100ml διηθήματος 1 + 40 ml PBS
↓
Διήθηση με ηθμούς Fiber Glass → διήθημα 2
↓
10ml διηθήματος 2 φορτώνονται στη στήλη ανοσοσυγγένειας – έχει προηγηθεί conditioning 10ml PBS
↓
Έκπλυση με 10ml PBS
↓
Έκπλυση junctions με 1.5ml MeOH ΚΑΙ 1.0ml νερού
↓
Εξάτμιση μέχρι ξηρού
↓
Επαναδιάλυση του υπολείμματος σε 1ml CAN/H₂O (30:70)
↓
Μέτρηση LC – MS / MS

ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ ΣΕ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ

Ζυγίζουμε 2,5 L δείγμα και μετά προσθέτουμε 2L νερό ,τα ομογενοποιούμε και μετά :

25gr δείγμα
+
100ml Acetonitrile / H₂O (60:40)
↓
Blending 3min
↓
Διήθηση με ηθμούς
↓
Conditioning της στήλης με 10 ml PBS

↓

40ml διήθημα + 44ml PBS

↓

Στήλη ανοσοσυγγένειας

↓

Έκπλυση με 10ml νερό

↓

Έκπλυση της OTA με 4ml MeOH (4*1m) σε σωλήνα

↓

Έκπλυση του μεθανολικού διαλύματος σε ρεύμα αζώτου

Στους 40°C μέχρι ξηρού. Επαναδιαλυτοποίηση στερεού με δ/μα MeOH / H₂O / CH₃COOH προσδιορισμός OTA.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Aflatoxin M1 σε Γάλα

- Θέρμανση γάλακτος στους 37°C σε υδρόλουτρο.
- Ζυγίζονται 50,00 + 0,1 gr γάλακτος σε σωλήνα φυγόκεντρου των 100ml
- Φυγοκέντρωση στις 4.000 στροφές για 15 λεπτά
- Στήλες Aflarper. Απομακρύνεται το υγρό που περιέχουν χωρίς να στεγνώσουν. Μεταφέρεται το γάλα στον πλαστικό υποδοχέα με τρόπο ώστε να μην μεταφερθεί η στιβάδα του λίπους με βοήθεια γυάλινης ράβδου
- Ροή γάλακτος απ' την στήλη : 1-2 ml το λεπτό
- Έκπλυση της στήλης με 10ml απιονισμένου νερού
- Έκπλυση αφλατοξίνης M1 απ' την στήλη ανοσοσυγγένειας με 2ml (500ml *4φορές) MeOH σε γυάλινο σωλήνα.
- Εξάτμιση μεθανολικού δ/τος σε ρεύμα αζώτου στους 40°C μέχρι 1ml. Μεταφορά δ/τος σε ογκομετρική των 2ml.
- Συμπλήρωση με νερό μέχρι την χάραξη.
- Προσδιορισμός με HPLC – FLD.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ M1 ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

1. Ζυγίζονται 20ml λεπτοδιαμερισμένου δείγματος σε ποτήρι ζέσης των 250ml.
2. Προστίθενται 75ml χλωροφόρμιο, 1μl δ/τος NaCl και 5gr Celite.
3. Το μίγμα ομογενοποιείται σε υψηλή ταχύτητα για 2 min.
4. Ο πολτός διηθείται με χάρτινο ηθμό 113V σε σφαιρική φιάλη.

5. Έκπλυση του ποτηριού ζέσεως με 50ml χλωροφόρμιο και διήθηση στον ανώτερο ηθμό.
6. Εξάτμιση από κενό στους 30°C του χλωροφορμικού εκχυλίσματος μέχρι ξηρού.
7. Στο υπόλειμμα προστίθενται 1ml μεθανόλης 30ml νερό 50ml εξάνιο και το μίγμα ανακινείται ήπια.
8. Το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη.
9. Το μίγμα εκχυλίζεται με 2*10 ml νερό και ανακινείται για 15 sec.
10. Συλλέγεται η κάτω στοιβάδα που θα χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό με τις στήλες ανοσοσυγγένειας.

Στάδιο 2

- 1) Εκπλένεται η στήλη ανοσοσυγγένειας με 10ml νερό.
- 2) Μεταφέρεται 50 ml εκχυλίσματος από το δείγμα στον υποδοχέα πάνω από τη στήλη με πικέτα των 10ml.
- 3) Η υδατική φάση διέρχεται απ' τη στήλη με ροή 23ml/min.
- 4) Στο τέλος διέρχονται απ' τη στήλη 10ml απιονισμένου νερού.
- 5) Η αφλατοξίνη M1 εκλύεται με 2ml ακετονιτρίλιο 4 φορές * 500ml.
- 6) Εξατμίζεται ο δ/της σχεδόν μέχρι Ζήρου με ροή αζώτου.
- 7) Το υπόλειμμα επαναδιαλύεται με όγκο 250ml μίγματος ακετονιτρίλιου / νερού (500ml MeOH : H₂O 1 : 1)
- 8) Φιλτράρουμε το δ/μα με μεμβράνη 0,2 μm πριν την ανάλυση.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DON ΣΕ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ

25gr δείγματος

+

200ml H₂O

↓

Blending

↓

Διήθηση με ηθμό

↓

8,0ml διηθήματος διέρχονται απ' την στήλη ανοσοσυγγένειας με ροή 1 σταγ./sec.

Έκπλυση της στήλης με 5ml H₂O. Στέγνωμα της στήλης με αέρα.

↓

Έκλυση της DON με 1,5ml MeOH σε γυάλινο σωλήνα.

↓

Εξάτμιση του μεθανολικού δ/τος με διαβίβαση N₂ στους 40°C. Επαναδιάλυση υπολείμματος σε 1,0 ml (νερό / ACN 80 – 2) Vortex 30sec.

↓

HPLC

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ZEARALENONE ΣΕ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ

25gr δείγματος

+

125ml Acetonitrile

↓

Blending 2min

↓

Διήθηση με ηθμούς Watman

↓

Conditioning στήλης με 10ml PBS

↓

5.0ml διήθημα + 20ml PBS

↓

Στήλη ανοσοσυγγένειας

↓

Έκπλυση με 10ml νερό

↓

Έκλυση της Zearalenone με 1.5ml Acetonitrile και μετά με 1,5 ml νερό σε ογκομετρική φιάλη των 3ml.

↓

HPLC

ΟΤΑ – ΚΑΦΕΣ (ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ)

35gr πολτού (καφές : νερό 10 : 25)

↓ +175ml υδατικό δ/γμα NaOH CO₃

↓ blending 3min

↓ filter

Conditioning 10ml PBS

↓

20ml δείγμα + 20 ml PBS τρέχουν αυτά

+ 10ml H₂O έκπλυση

↓ 750ml MeOH CH₃COOH (98 : 2)

750 ml MeOH CH₃COOH (98 : 2)

1.5 ml H₂O

Συμπληρώνουμε στα 3ml HPLC.

ΟΤΑ ΣΤΑΦΙΔΑ (ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ)

25gr δείγματος

↓ 175ml δ/μα NaOHCO₃

↓ blending

↓ filter

Conditioning 10ml PBS

↓ 10ml δείγμα 10ml PBS τρέχουν

και μετά

↓

10ml νερό έκπλυση

↓

750ml MeOH CH₃COOH (98 : 2)

750ml MeOH CH₃COOH (98 : 2)

1,5ml H₂O

Συμπληρώνουμε 3ml ογκομετρική.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟ-ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Οι περισσότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό μιας μυκοτοξίνης βασίζονται στην ακριβή και σωστή απομόνωση και στις μεθόδους καθαρισμού. Η προετοιμασία του δείγματος είναι ζωτικής σημασίας για ένα επιτυχημένο πρωτόκολλο και επηρεάζει την τελική επιλογή της διαδικασίας ανίχνευσης. Η μέθοδος απομόνωσης που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των μυκοτοξινών από το βιολογικό στρώμα, εξαρτάται από τη δομή των τοξινών. Οι πολικοί μεταβολίτες όπως οι φουμονισίνες απαιτούν προσθήκη νερού κατά την

παρουσία οργανικών διαλυτών . Η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από το στρώμα από το οποίο γίνεται η εκχύλιση, αφού τα διαφορετικά χημικά μίγματα μπορούν να τον επηρεάσουν. Η χρήση χλωριωμένων τεχνικών για την απομόνωση μειώνεται σταδιακά διότι αποτελούν οικολογικά απόβλητα⁸.

Η διαδικασία του καθαρισμού που χρησιμοποιείται σε ένα πρωτόκολλο αποτελεί το πιο σημαντικό βήμα, αφού η καθαρότητα του δείγματος επηρεάζει την ευαισθησία των αποτελεσμάτων. Τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι αποστειρωμένα και να μην έχουν ίχνος μυκοτοξίνης.

2.2.1 ΥΓΡΗ - ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) περιλαμβάνει την απομόνωση της τοξίνης λόγω διαφορετικής διαλυτότητας στην υδατική φάση και στην αμιγή οργανική φάση διαχωρίζοντας έτσι τον μεταβολίτη μέσα σε ένα διαλύτη και αφήνοντας το υπόλοιπο στην άλλη πλευρά. Διαλύτες όπως το εξάνιο και το κυκλοεξάνιο χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση μη πολικών μολυσμάτων (λιπίδια και χοληστερόλη). Η διαδικασία αυτή είναι αποτελεσματική για πολλές τοξίνες. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η απώλεια δείγματος λόγω προσρόφησης στα γυάλινα σκεύη.

2.2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ (SPE)

Η βασική αρχή της συγκεκριμένης τεχνολογίας είναι μία ποικιλία από χρωματογραφικές τεχνικές οι οποίες στηρίζονται σε μικρά απορριπτέα σφαιρίδια τα οποία πακετάρονται μαζί με το Silica gel. Το δείγμα φορτώνεται σε ένα διαλύτη, υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης όπου οι περισσότεροι από τους μεταβολίτες απομακρύνονται και μεταφέρονται σε άλλο διαλύτη. Αυτά τα σφαιρίδια περιέχουν διαφορετικές δομικές φάσεις που εκτείνονται από το silica gel, C-18

⁸ EMAN, 2003. European Mycotoxin Awareness Network co-ordinated by Leatherhead Food Research Association (UK). <http://www.lfra.co.uk/eman/index.htm>.

(octadecylsilane), florisil, phenyl, aminopropyl και υλικά ανταλλαγής ιόντων μέχρι τα υλικά συγγένειας όπως είναι οι ανοσοπροσοροφητές και τα μοριακά πολυμερή⁹.

Οι δεσμευμένες φάσεις ανταλλαγής ανιόντων παρέχουν καλό καθαρισμό των εκχυλίσεων που περιλαμβάνουν (FUMs).

Η τεχνική της SPME (Solid Phase Micro-Extraction) σε συνδυασμό με την HPLC-UV/DAD έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για το προσδιορισμό του μυκοφαινολικού οξέος στο τυρί. Ο ίδιος συνδυασμός τεχνικών εφαρμόζεται και στον προσδιορισμό της πατουλίνης. Όσον αφορά στις φουμονισίνες B1 και B2, η τεχνική της SPE ανάστροφης φάσης (C-18) εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό τους από δείγματα πλάσματος και ούρων, ενώ ο καθαρισμός πραγματοποιείται μέσω της HPLC ανάστροφης φάσης.

Σήμερα, η SPE είναι η πιο δημοφιλής εργαστηριακή τεχνική ρουτίνας ανάλυσης των μυκοτοξινών. Παρ' όλ' αυτά, παρουσιάζει βασικά μειονεκτήματα, όπως: (α) είναι σχεδόν αδύνατον να υπάρχει μόνο μία στήλη διαχωρισμού για όλες τις μυκοτοξίνες και (β) κάθε τύπος πρέπει να χειριστεί σε διαφορετικές συνθήκες για την ανάλυση (pH, μείγμα διαλυτών κλπ.).

Η silica gel είναι το πιο κοινό υλικό πλήρωσης των στηλών ανάλυσης, μιας και προσφέρει τη δυνατότητα πολλαπλής σιλανοποίησης και ανάπτυξης διαφορετικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Οι συγκεκριμένες στήλες ανάλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι απευθείας, είτε και μετά από επεξεργασία για την κατάλληλη τροποποίηση των ιδιοτήτων τους.

2.3 ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (TLC)

Παραδοσιακά η πιο διαδεδομένη τεχνική ανάλυσης των μυκοτοξινών, αφού είναι αρκετά οικονομική και προσφέρει τη δυνατότητα της ταυτόχρονης ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Επιπλέον, ενδείκνυται για ποσοτικές αναλύσεις μυκοτοξινών σε δείγματα ανθρώπων και ζώων. Ωστόσο, κύρια προϋπόθεση για την ανάλυση οποιασδήποτε ουσίας είναι η προετοιμασία των δειγμάτων και ο

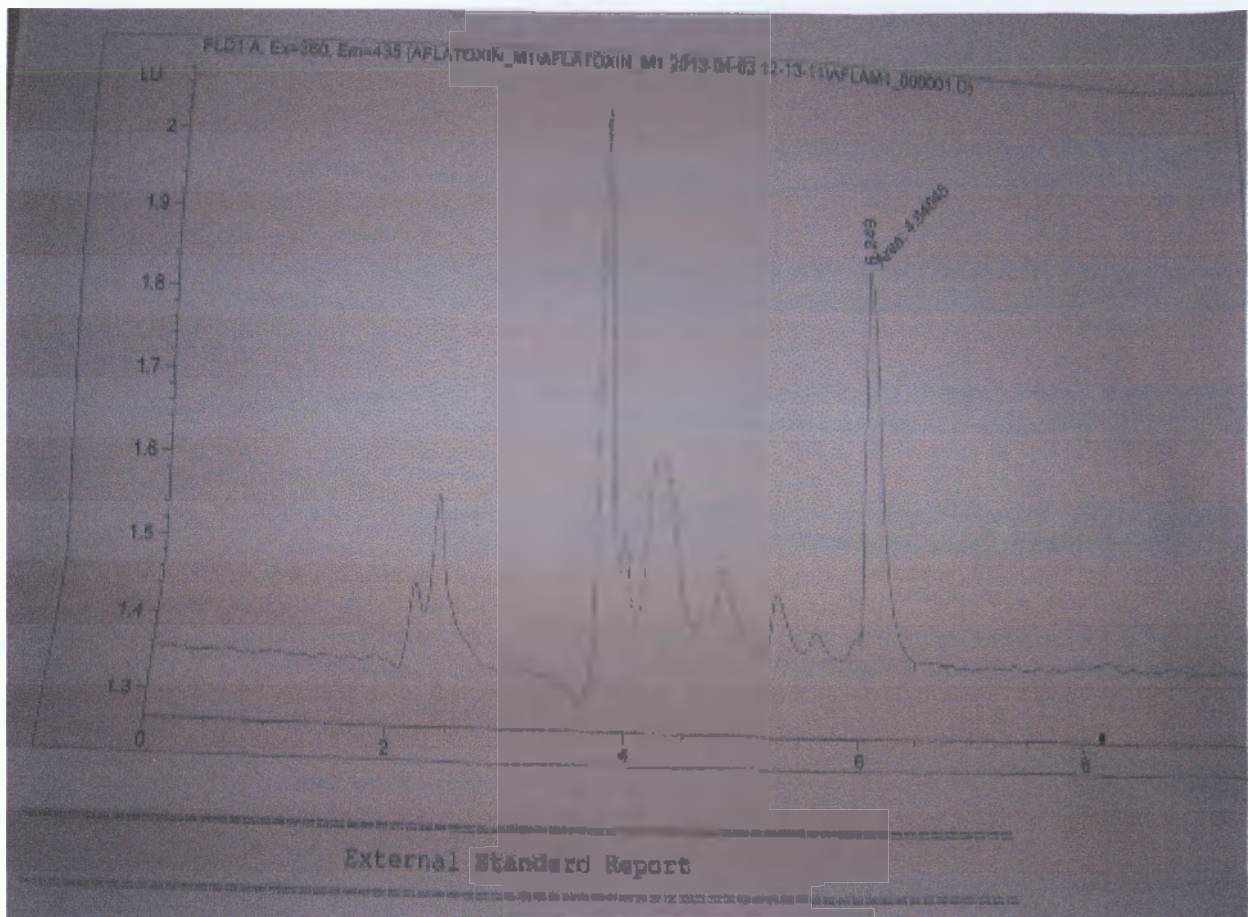
⁹ Montreal Protocol. 1998. <http://www.uneptie.org/ozonaction/compliance/protocol/main.html>, accessed 09 June 2003.

προηγούμενος καθαρισμός τους. Ανάλογα με την κατηγορία των μυκοτοξινών πραγματοποιείται και καθαρισμός τους μέσω διαφόρων τεχνικών, όπως ELISA, HPLC, κ.ά. .

2.3.2 ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (HPLC)

Η νέα ανάλυση των μυκοτοξινών βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC (Εικόνα 2.1.) περιλαμβάνοντας διάφορες προσροφητικές ουσίες που εξαρτώνται από τη φυσική και χημική δομή των μυκοτοξινών. Οι στήλες κανονικής και ανάστροφης φάσης χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και τον καθαρισμό τοξινών που εξαρτώνται από την πολικότητα τους. Επίσης, χρησιμοποιούνται μικρές στήλες για την προεπεξεργασία του δείγματος και μεγάλης κλίμακας στήλες για την προετοιμασία των προτύπων διαλυμάτων των μυκοτοξινών . Στην ουσία, τα περισσότερα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται στην HPLC για την ανίχνευση των μυκοτοξινών είναι παρόμοια. Οι πιο κοινές μέθοδοι ανίχνευσης είναι οι ανιχνευτές UV ή φθορισμού, οι οποίοι στηρίζονται στην παρουσία ενός χρωμοφόρου στα μόρια. Η HPLC αποτελεί τη βασική τεχνική ανίχνευσης των μυκοτοξινών και περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό πρωτοκόλλων για την ανάλυση της ωχρατοξίνης A . Η φασματοφωτομετρία μάζας αποτέλεσε και αυτή πρότυπη μέθοδο ανίχνευσης επιτρέποντας υψηλή ακρίβεια και εξειδικευμένη ανίχνευση των τοξινών. Οι ανιχνευτές αυτοί σχετίζονται και με άλλες μεθόδους διαχωρισμού όπως η HPLC και η GC (gas chromatography). Οι περιοριστικοί παράγοντες στη χρήση της φασματοφωτομετρίας μάζας ως εργαλείο ανάλυσης είναι το υψηλό κόστος του εξοπλισμού, οι περίπλοκες εργαστηριακές απαιτήσεις και οι περιορισμοί στον τύπο των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην απομόνωση και το διαχωρισμό.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της HPLC είναι η υψηλή ποιότητα διαχωρισμού και η δυνατότητα συνδυασμού πολλών συστημάτων ανίχνευσης (φθορισμός, UV) με τη συγκεκριμένη τεχνολογία, επιτρέποντας έτσι πολλαπλές ανιχνεύσεις των συστατικών από ένα δείγμα. Επίσης, μπορεί και να αυτοματοποιηθεί γεγονός το οποίο της προσφέρει ένα προβάδισμα σε σχέση με την TLC και την ELISA.



Εικόνα 2.1 : Χρωματογράφημα HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή ανάπτυξης ΜΙ συγκέντρωσης 0,5 µg/l (ppb) φθορίζει όταν διεγερθεί για 360nm και εκπέμπει στα 455 nm

2.3.3 ΑΕΡΙΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC)

Η αέριος χρωματογραφία χρησιμοποιείται φυσιολογικά για την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση της παρουσίας των μυκοτοξινών στα δείγματα τροφίμων και έχουν αναπτυχθεί πολλά πρωτόκολλα για αυτήν την μέθοδο. Φυσιολογικά, η μέθοδος σχετίζεται με τη φασματοφωτομετρία μάζας, τον ανιχνευτή ιονισμού φλόγας με σκοπό την ανίχνευση πτητικών προϊόντων. Οι περισσότερες μυκοτοξίνες δεν είναι πτητικές και επομένως πρέπει να παραγωγοποιηθούν για ανάλυση με τη χρήση GC. Έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές για την παραγωγοποίηση των μυκοτοξινών. Οι χημικές αντιδράσεις όπως η πολυφλουοροακυλίωση χρησιμοποιούνται για να δώσουν ένα πτητικό υλικό. Όπως και με τις άλλες μυκοτοξίνες, η οχρατοξίνη Α δεν μπορεί να καθοριστεί άμεσα από την αέριο χρωματογραφία αφού δεν είναι πτητική. Παρόλο που έχουν αναφερθεί αρκετά παραδείγματα επιτυχούς εφαρμογής της GC στην

ανάλυση των μυκοτοξινών, υπάρχουν και αρκετά μειονεκτήματα. Αρχικά, τα δείγματα που χρειάζονται ανάλυση πρέπει να είναι πτητικά ή αλλιώς να μετατραπούν σε πτητικά. Επιπλέον, η θερμική σταθερότητα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα, διότι πολλές φορές η θέρμανση αποικοδομεί τα δείγματα.

Σημειώνεται ότι με διάφορες ανοσοχημικές τεχνικές, όπως η ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay), ο προσδιορισμός των αφλατοξινών στα τρόφιμα αποτελεί πλέον μία σχετικά απλή αναλυτική διαδικασία, ενώ ακριβέστερες μετρήσεις πραγματοποιούνται κατά κανόνα με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Ο προσδιορισμός των αφλατοξινών στον άνθρωπο γίνεται με τη χρήση δύο τεχνικών. Στην πρώτη μετρείται η ένωση προσθήκης AFM1-γουανίνης στα ούρα. Η παρουσία αυτού του προϊόντος μεταβολισμού δείχνει έκθεση σε αφλατοξίνες κατά τις προηγούμενες 24 ώρες. Παρ' όλ' αυτά δεν είναι αρκετά ικανοποιητική μέθοδος, λόγω της διάσπασης της ένωσης προσθήκης με την πάροδο του χρόνου. Όσον αφορά στη δεύτερη τεχνική, στηρίζεται στον προσδιορισμό της ένωσης προσθήκης AFB1-αλβουμίνης στο πλάσμα του αίματος. Ο προσδιορισμός είναι ακριβέστερος, θετικός κατά 90% στα θετικά δείγματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μακροχρόνιες εκθέσεις, αφού παραμένει θετικός για 2-3 μήνες μετά την έκθεση σε αφλατοξίνες. Σε αντίθεση με τις περισσότερες μυκοτοξίνες που είναι υδατοδιαλυτές, οι φουμονισίνες είναι υδρόφοβες, γεγονός που τις καθιστά δύσκολες στη μελέτη τους. Συνήθως, εκχυλίζονται με τη βοήθεια μιγμάτων μεθανόλης – νερού ή με ακετονιτρίλιου – νερού. Η ανίχνευσή τους πραγματοποιείται είτε με τη χρήση της HPLC (High Performance Liquid Chromatography), είτε μέσω φθορίζοντων χημικών ομάδων.

2.4 Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ

Σε γενικές γραμμές, οι σοδειές που αποθηκεύονται για περισσότερες από μερικές μέρες γίνονται πιθανός στόχος ανάπτυξης μούχλας και σχηματισμού μυκοτοξινών. Τα βασικότερα τροφικά αγαθά που μολύνονται είναι τα δημητριακά, τα καρύδια, ο καφές, το κακάο, τα αποξηραμένα φρούτα, τα καρυκεύματα, τα αποξηραμένα μπιζέλια, τα φασόλια και φρούτα και κυρίως τα μήλα. Οι μυκοτοξίνες μπορούν επίσης να ανιχνευθούν στη μύρα και στο κρασί που αποτελούν το αποτέλεσμα της χρησιμοποίησης μολυσμένου κριθαριού, άλλων δημητριακών και σταφυλιών κατά την παραγωγή τους. Επίσης, μπορούν να εισέλθουν μέσω του

κρέατος ή άλλων ζωικών προϊόντων όπως το γάλα, τα αυγά και το τυρί ως αποτέλεσμα μολυσμένων ζώων φάρμας. Συχνά είναι γενοτυπικά εξειδικευμένοι, αλλά μπορούν να παραχθούν από 1 ή περισσότερα είδη μυκήτων. Η πλειοψηφία των μυκοτοξινών, των δευτερογενών δηλαδή μεταβολιτών, συντίθενται με απλές βιοσυνθετικές αντιδράσεις μικρών μορίων. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι μεταβολίτες έχουν διαφορετικό εύρος τοξικών οξείων και χρόνιων επιδράσεων.

Οι μυκοτοξίνες μπορούν να εμφανιστούν στην τροφική αλυσίδα ως συνέπεια της μυκητιακής μόλυνσης, είτε με την άμεση κατανάλωση από τους ανθρώπους, είτε με τη χρησιμοποίηση ως τροφή ζωικού κεφαλαίου. Οι μυκοτοξίνες αντιστέκονται πολύ στην αποσύνθεση και στην πέψη, οπότε παραμένουν στην τροφική αλυσίδα στο κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ούτε οι επεξεργασίες θερμοκρασίας, όπως το μαγείρεμα και το πάγωμα, δεν καταστρέφουν τις μυκοτοξίνες.

2.5 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Ορισμένα είδη μυκήτων *Aspergillus* μπορούν να παράγουν μυκοτοξίνες. Αυτά τα είδη *Aspergillus* δεν παράγουν συνεχώς μυκοτοξίνες, αλλά μπορεί να προκληθεί η παραγωγή από διάφορους παράγοντες όπως το στρες. Οι μυκοτοξίνες αυτές παράγονται κυρίως από το είδος *Aspergillus flavus* και ονομάζονται αφλατοξίνες.

2.5.1 ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΩΣΗ

Το σύνολο των ασθενειών που προκαλούνται στον άνθρωπο, από την έκθεση στον *Aspergillus* είναι γνωστό ως ασπεργίλλωση. Οι κύριες ασθένειες της ασπεργίλλωσης είναι οι εξής:

- Αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση
- Οξεία διηθητική ασπεργίλλωση

2.5.1.1 ΑΛΛΕΡΓΙΚΗ ΒΡΟΓΧΟΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΩΣΗ

Η αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση συνήθως προκαλείται από τον μύκητα *Aspergillus fumigatus*. Η αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση (ABPA) είναι μια ασθένεια όπου το ανοσοποιητικό σύστημα ενός ατόμου είναι

υπερευαίσθητο σε σπόρια μυκήτων. Αυτή η υπερευαίσθησία προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις στο πρόσωπο, καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα προσπαθεί να εκδιώξει τα σπόρια από το σώμα. Οι άνθρωποι με κυστική ίνωση ή άσθμα είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι στην αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση, με περίπου το 5% των ασθματικών να υφίστανται αυτήν την ασθένεια σε κάποια στιγμή στη ζωή τους.

Συμπτώματα:

- Δυσκολία στην αναπνοή και δύσπνοια
- Συριγμός
- Τα συμπτώματα του άσθματος, κρίσεις άσθματος
- Βλεννώδης βήχας
- Βήχας με αιμόπτυση
- Παραρρινοκολπίτιδα (μόλυνση ή φλεγμονή των κόλπων)
- Απώλεια της όρεξης
- Πυρετός
- Γενική δυσφορία και αδιαθεσία
- Σε μεταγενέστερα στάδια μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους πνεύμονες (ίνωση)

Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά τοξικές, καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες και ανοσοκατασταλτικές ουσίες. Η αφλατοξίνη Β1 θεωρείται ως το ισχυρότερο γνωστό καρκινογόνο του ήπατος με αποδεδειγμένη γεννοτοξικότητα. Χαρακτηριστικά, αναφέρεται ότι η καρκινογόνος δράση του είναι περίπου 1000 φορές ισχυρότερη του βενζοπυρενίου, ενός πολυκυρηνικού υδρογονάνθρακα που αποτελεί το δραστικότερο μεταλλαξιογόνο συστατικό του καπνού των τσιγάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

3.1 ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία κατατάσσει τις μυκοτοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων (Καν. 1881/2006)¹⁰. Οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των διαφόρων μυκήτων και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατό να απαλειφθούν πλήρως οι μυκοτοξίνες από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Συνιστάται επομένως να περιορίζεται η παρουσία τους στο κατώτατο εφικτό επίπεδο. Η μείωση της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτού του είδους τις τοξικές ουσίες αποτελεί μέγιστη προτεραιότητα με ταυτόχρονη μείωση των ορίων.

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω επιπτώσεις στον άνθρωπο θεωρείται σκόπιμο να περιοριστεί τόσο η συνολική περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες στα τρόφιμα, όσο και η περιεκτικότητα σε κάποιες συγκεκριμένες τοξίνες (αφλατοξίνη Β1). Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αφλατοξίνη Μ1 θεωρείται ως γονοτοξική καρκινογόνος ουσία ίση ή λιγότερο επικίνδυνη από ότι η αφλατοξίνη Β1, είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η περιεκτικότητά της στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από ανθρώπους και ιδίως από μικρά παιδιά. Αναμφίβολα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν και οι πιο ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού και κυρίως τα βρέφη.

Η θέσπιση των μέγιστων ορίων για την παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεί μια σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μέγιστων συγκεντρώσεων απαιτείται συνυπολογισμός και εκτίμηση πολλών παραγόντων όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η οξεία και χρόνια τοξικότητα. Παράλληλα πρέπει να υπάρχει σύνδεση των παραπάνω με την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και την ποσότητα στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές. Σήμερα δεν είναι γνωστό κάποιο όριο κάτω από το οποίο να μην παρατηρούνται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή από τις μυκοτοξίνες, συνεπώς δεν μπορεί να οριστεί ανεκτή ημερήσια πρόσληψη. Συνεπώς, η Ε.Ε. έχει θεσπίσει νομοθετικά όρια στα υλικά που προορίζονται για χρήση ως τρόφιμα ή ως ζωοτροφές .

¹⁰ Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 «για καθορισμό μέγιστων επιτρεπών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα».

Για τη θέσπιση των μέγιστων ορίων λαμβάνονται υπ' όψιν πολλοί διαφορετικοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και άλλα σώματα, τα οποία συμπεριλαμβάνονται σε αυτή τη διαδικασία. Μία περίληψη για την τοξικολογική εκτίμηση των μυκοτοξινών με αναφορά στην επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον πραγματοποιείται με τη συνεργασία μεταξύ των ακόλουθων οργανισμών:

• Διεθνές Πρόγραμμα για την Χημική Ασφάλεια (International Program on Chemical Safety–IPCS, www.who.int/pcs/)

• Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency on Research on Cancer–IARC, www.iarc.fr)

• Κοινή FAO/WHO Επιτροπή για τα Πρόσθετα και τους Επιμολυντές των Τροφίμων (Joint FAO/WHO Committee on Food Additives and Contaminants– JECFA, www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm.)

Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης αυτή η εκτίμηση διεξάγεται υπ' ευθύνη της Επιστημονικής Επιτροπής για τα Τρόφιμα¹¹. Επιπρόσθετα αρκετές ομάδες εργασίας και ειδικές επιτροπές με εξουσιοδότηση από όλα τα κράτη μέλη προετοιμάζουν τις προτάσεις. Η μέγιστη τιμή που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση πχ. για κελυφωτά φιστίκια που προορίζονται για άμεση κατανάλωση ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα είναι 2,0 μg/kg (ppb) για την αφλατοξίνη B1 και 4,0 μg/kg (ppb) για το άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2. Για την αφλατοξίνη B1 έχει θεσπιστεί ξεχωριστό όριο. Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία αναγνωρίζει ότι οι μέθοδοι διαλογής ή άλλες φυσικές διαδικασίες επιτρέπουν να μειωθεί η περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες σε διάφορα τρόφιμα όπως: στα αράπικα φιστίκια, στους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, στα ξηρά φρούτα και στον αραβόσιτο. Έτσι, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις στο εμπόριο, γίνονται αποδεκτές υψηλότερες περιεκτικότητες από τις προαναφερόμενες σε μυκοτοξίνες για τα εν λόγω προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων.

Επομένως, στις περιπτώσεις αυτές, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις μυκοτοξίνες έχουν καθοριστεί λαμβανομένης υπόψη της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών που ακολουθούν και ειδικά για τα κελυφωτά φιστίκια είναι 5,0 μg/kg (ppb) για την B1 και 10,0 μg/kg (ppb) για το άθροισμα των B1, B2, G1 και G2. Στις παρτίδες που ανιχνεύθηκαν μυκοτοξίνες μέσα στα όρια που προορίζονται για διαλογή

¹¹ Διαθέσιμο online: http://europa.eu.int/comm/food/fs/cs/csf/index_en.html

ή άλλη φυσική κατεργασία θα πρέπει να υπάρχει και η ανάλογη σήμανση. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης των τροφίμων με τα καθορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία τα τρόφιμα αυτά θεωρούνται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση και απαγορεύεται η χρήση τους ως συστατικά τροφίμων. Επιπλέον, απαγορεύεται να αναμειγνύονται με καθαρά από μυκοτοξίνες τρόφιμα, αλλά και να υπόκεινται σε χημικές κατεργασίες για την απομάκρυνσή τους.

3.2 ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Τα πορίσματα των επιστημονικών μελετών από όλο τον κόσμο συντείνουν στο ότι η παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα θέτει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Αυτό έχει οδηγήσει τόσο σε εντατικούς ελέγχους όσον αφορά την παρουσία τους στα διάφορα τρόφιμα όσο και στην καθιέρωση ορίων, όπως και στην Ε.Ε. Νομοθετικοί κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες υπάρχουν σε πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως. Στις ανεπτυγμένες χώρες του κόσμου, όπου η διάρκεια ζωής έχει αυξηθεί σε συνδυασμό με την βελτίωση της ποιότητας ζωής παρατηρείται μεγαλύτερη προσπάθεια όσον αφορά τον έλεγχο των αφλατοξινών. Αντίθετα στο μεγαλύτερο ποσοστό των αναπτυσσόμενων χωρών, κύριο μέλημα αποτελεί η καταπολέμηση της φτώχειας και των ασθενειών με αποτέλεσμα να μην έχουν καθιερωθεί, ευρέως, κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες γενικότερα ή να μην είναι το ίδιο αυστηροί.

Εντούτοις, αν και η θέσπιση των ανώτερων ορίων είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών φορέων παρατηρούνται διαφορετικά όρια ανάμεσα στα διάφορα κράτη. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στις Η.Π.Α. το μέγιστο επιτρεπτό όριο για την παρουσία αφλατοξινών ανέρχεται στα 20 ppb για τρόφιμα και ζωοτροφές, ενώ για τα κελυφωτά φιστίκια στα κράτη της Ε.Ε. στα 2 ppb για την AFB 1 και 4 ppb για το άθροισμα των αφλατοξινών, όπως προαναφέρθηκε. Αυτό σημαίνει ότι στην ΕΕ τα όρια είναι 5 φορές χαμηλότερα απ' ότι στις Η.Π.Α. Παράλληλα ο αρμόδιος αμερικανικός φορέας έχει θέσει ως όριο για την AFM 1 στο γάλα και τα συναφή προϊόντα την τιμή 0.5 μg/Lt, ενώ στην Ε.Ε. η αντίστοιχη τιμή είναι 0.05 μg/Lt. Στην πράξη, τα διαφορετικά όρια, που έχουν θεσπιστεί στις διάφορες χώρες του κόσμου προκαλούν ενδεχόμενα προβλήματα στο διεθνές εμπόριο, εις βάρος συνήθως των λιγότερο αναπτυγμένων χωρών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Από τότε που αναφέρθηκαν οι μυκοτοξινώσεις (αρχές της δεκαετίας του '60) οι ερευνητές σε όλο τον κόσμο έψαχναν επισταμένα τρόπους να περιορίσουν ή να ελαχιστοποιήσουν τις επιδράσεις αυτών των αναπόφευκτων μολύνσεων. Λόγω της μεγάλης ποικιλότητας των μυκοτοξινών και των διαφόρων χημικών παράγωγων τους, οι οποίες είναι ικανές να μολύνουν τις ζωοτροφές, η προστασία από τις μυκοτοξινώσεις αποδείχθηκε σχετικά δύσκολο εγχείρημα. Μεταξύ όλων των διαθέσιμων προσεγγίσεων για να ελεγχθεί η επιμόλυνση με μυκοτοξίνες, η απλούστερη στρατηγική βασίζεται στην πρόληψη της δημιουργίας της μυκοτοξίνης στις τροφές. Ακόμα και με τις σημερινές σύγχρονες τεχνολογίες είναι πολύ δύσκολη η πρόβλεψη ή αποτροπή της ύπαρξής τους, είτε προ της συγκομιδής είτε κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της επεξεργασίας των ζωοτροφών. Όταν οι πρώτες ύλες έχουν προσβληθεί από μυκοτοξίνες, η εξάλειψη του προσβληθέντος προϊόντος είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για να αποφευχθούν τα προβλήματα που θα ακολουθήσουν από την κατανάλωσή του. Δυστυχώς, λόγω της δυσκολίας που υπάρχει στη λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος, είναι αρκετά αμφίβολος ο ακριβής προσδιορισμός του μεγέθους της προσβολής για κάθε τροφή. Η μη πρακτικότητα και το κόστος που συνοδεύει την αντικατάσταση αυτών των υλικών συνεπάγεται ότι αυτή η πρακτική δεν εφαρμόζεται τόσο συχνά όσο συστήνεται. Έτσι, οι μυκοτοξίνες συνήθως υπάρχουν στις ζωοτροφές και επιφέρουν σημαντικές οικονομικές απώλειες στις γεωργοκτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις. Εκτός αυτού, οι μυκοτοξίνες προκαλούν ανησυχία για τη δημόσια υγεία, επειδή τα ζώα που καταναλώνουν μολυσμένες με μυκοτοξίνες τροφές αφήνουν κατάλοιπα αυτών των τοξινών στα παραγόμενα ζωικά προϊόντα.

Η απομάκρυνση ή εξουδετέρωση των μυκοτοξινών από μία προσβεβλημένη ζωοτροφή επιτυγχάνεται με φυσικές, χημικές και βιολογικές μεθόδους. Οι χημικές διαδικασίες, όπως η επεξεργασία με οξέα, η αμμωνιοποίηση, η οξονοποίηση και η αντίδραση με τροφικά πρόσθετα όπως το δισουλφιδικό νάτριο έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικά στην αποδόμηση και στην τελική εξουδετέρωση της αφλατοξίνης. Οι βιολογικές μέθοδοι που πρωταρχικά συμπεριελάμβαναν την

αποδόμηση της τοξίνης από μικροοργανισμούς, καταλαμβάνουν όλο και περισσότερο χώρο, αφού δείχνουν τα θετικότερα αποτελέσματα. Οι φυσικές διαδικασίες, όπως η ταξινόμηση, η θερμική απενεργοποίηση, η ακτινοβολία ή η εξαγωγή του προσβληθέντος προϊόντος έχουν σημειώσει επίσης αρκετή επιτυχία. Η κάθε μέθοδος απομάκρυνσης ή αποτοξίνωσης για υλικά ζωοτροφών που έχουν προσβληθεί από μυκοτοξίνες πρέπει να πληροί τους παρακάτω όρους:

1. Να είναι αποτελεσματική στην απομάκρυνση, καταστροφή και εξουδετέρωση της μυκοτοξίνης.
2. Να μην παράγει τοξικά ή καρκινογόνα/μεταλλαξιογόνα κατάλοιπα, ούτε στα επεξεργασμένα ούτε στα ζωικά προϊόντα που προέρχονται από ζώα που καταναλώνουν αυτές τις ζωοτροφές.
3. Να μη μεταβάλλουν τις θρεπτικές ιδιότητες των ζωοτροφών ή να επηρεάζουν τη λήψη τους.
4. Να είναι οικονομικά και τεχνολογικά αποδεκτές, έτσι ώστε να μην επηρεάζουν σημαντικά το κόστος του τελικού προϊόντος.

Πολλές από τις φυσικές, χημικές και βιολογικές μεθόδους είναι αποτελεσματικές στη μείωση, καταστροφή ή εξουδετέρωση των μυκοτοξινών, όμως σπάνια ανταποκρίνονται σε άλλες εξίσου σημαντικές απαιτήσεις. Οι κυριότερες διατροφικές προσεγγίσεις, όπως η συμπλήρωση των θρεπτικών συστατικών ή πρόσθετων με προστατευτικές ιδιότητες κατά των μυκοτοξινών και η προσθήκη μη θρεπτικών ουσιών με ιδιότητες μείωσης της βιοδιαθεσιμότητας των μυκοτοξινών, μπορούν να καθαρίσουν ή να αποτοξινώσουν τα προσβληθέντα υλικά και συγχρόνως να πληρούν και τους ανωτέρω όρους. Η χρήση διατροφικών μη θρεπτικών συμπληρωμάτων με ιδιότητες απομάκρυνσης των μυκοτοξινών είναι η πιο πρακτικά εφαρμόσιμη μέθοδος. Αποτελεσματική είναι μία ουσία που αποτρέπει ή ελαχιστοποιεί την απορρόφηση της τοξίνης από τον γαστρεντερικό σωλήνα του ζώου. Η ιδανική ουσία πρέπει να είναι αποτελεσματική σε διάφορες μυκοτοξίνες, μιας και τα υλικά συνήθως προσβάλλονται με περισσότερες της μίας μυκοτοξίνης. Επιπρόσθετα, πρέπει να είναι απαλλαγμένες από ακαθαρσίες, τυχόν γεύσεις και οσμές. Τέλος, για να είναι πρακτικά εφαρμόσιμες και χρηστικές οι ουσίες αυτές πρέπει να έχουν λογικές τιμές και να μην καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος στα

ολοκληρωμένα σιτηρέσια. Η χρήση των μη θρεπτικών ουσιών απομάκρυνσης πρέπει να μειώνει την τοξική δράση της μυκοτοξίνης και τη δυνατότητα μεταφοράς της τοξίνης στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Οι κύριες κατηγορίες ουσιών είναι τα πυριτικά ορυκτά, ο ενεργοποιημένος άνθρακας, οι πολυμερείς ενώσεις, τα προϊόντα χλωροφύλλης και προϊόντα που προέρχονται από τη ζύμη.

Ενεργοποιημένος Άνθρακας. Είναι μια άμορφη μάζα κάρβουνου που θερμαίνεται απουσία αέρα και στη συνέχεια επεξεργάζεται με οξυγόνο, με σκοπό να δημιουργηθούν εκατομμύρια πόροι μεταξύ των ατόμων του άνθρακα. Η πηγή του άνθρακα επιλέγεται από μία ποικιλία υλικών, όπως τα κελύφη των καρυδιών, το μαλλί, τα βρύα. Αυτή η προσροφητική σκόνη χρησιμοποιείται ευρέως σε περιπτώσεις οξέων δηλητηριάσεων από τον 19ο αιώνα μέχρι σήμερα, ενώ είναι πολύ αποτελεσματική στην εξουδετέρωση της αφλατοξίνης και άλλων μυκοτοξινών. Οι ιδιότητές του εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του μεγέθους των πόρων, της επιφάνειας, της δομής της μυκοτοξίνης και της δόσης χορήγησης.

Ορυκτά πυριτίου. Η μεγαλύτερη και πολυπλοκότερη ομάδα εξουδετερωθεισών ουσιών των μυκοτοξινών είναι τα ορυκτά πυριτίου, η οποία διαχωρίζεται σε δύο σημαντικές υποομάδες, τη φυλλοπυριτική και την τεκτοπυριτική. Στους αργίλους που ανήκουν στη φυλλοπυριτική ομάδα συμπεριλαμβάνεται κυρίως ο μπεντονίτης, ενώ στις τεκτοπυριτικές ουσίες ανήκει ο σημαντικός και ευρέως χρησιμοποιημένος ζεολίτης.

Χολεστυραμίνη. Μία ένωση που χρησιμοποιείται σήμερα στην ιατρική για την απορρόφηση των οξέων της χολής από τον γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά και ως φάρμακο για τη θεραπεία της υπερλιπιδαιμίας. Η χολεστυραμίνη είναι ικανή να απομονώσει την ωχρατοξίνη και τη ζεαραλενόνη.

Παράγωγα χλωροφύλλης (χλωροφυλλίνη). Η χλωροφυλλίνη, το υδατοδιαλυτό παράγωγο της χλωροφύλλης των φυτών, είναι αποτελεσματική στη μείωση της τοξικότητας που προέρχεται από τις αφλατοξίνες. Οι ερευνητές απέδιδαν τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες αυτού του παράγωγου της χλωροφύλλης στην αντιοξειδωτική του δράση. Πρόσφατες μελέτες όμως αποκάλυψαν ότι το ενδιάμεσο προϊόν μεταξύ της χλωροφυλλίνης και της αφλατοξίνης είναι πραγματικά η κύρια ένωση που ευθύνεται για τη χημειοπροστασία.

Παράγωγα προερχόμενα από τη ζύμη. Αρχικά, μελέτες με ζυμοκύτταρα οδήγησαν στον προσδιορισμό ειδικού μέρους του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης,

το οποίο αντιδρά με τις μυκοτοξίνες. Η βελτίωση των τεχνικών επέτρεψε την παραγωγή τροποποιημένων ειδικά κυτταρικών τοιχωμάτων της ζύμης, τα οποία έχουν την ιδιότητα να απορροφούν διάφορες μυκοτοξίνες. Το προϊόν αυτό είναι εμπορικά διαθέσιμο ως *Mycosorb (Alltech Inc)*. Η απορροφητική δυνατότητα του συμπλέγματος των υδατανθράκων των κυτταρικών τοιχωμάτων της ζύμης προσφέρει μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση στους ανόργανους απορροφητές. Ο μεντονίτης και ο ενεργοποιημένος άνθρακας γενικά, χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες (>1,0% του σιτηρεσίου) στις ζωοτροφές. Όμως σε ζώα όπως τα κοτόπουλα και τα νεαρά χοιρίδια, όπου η πρόσληψη της τροφής μπορεί να περιορίσει την οικονομική αποδοτικότητά τους, είναι σημαντικό τα μη θρεπτικά πρόσθετα των τροφών να καταλαμβάνουν το μικρότερο δυνατό χώρο. Εκτός αυτού, υψηλά επίπεδα συμμετοχής μπορεί να αυξήσουν την εξουδετερωτική δράση της ουσίας και έτσι να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα άλλων σημαντικών θρεπτικών ουσιών. Αντίθετα, η υψηλή σχέση μεταξύ τοξίνης και απορροφητικότητας των παραγώγων του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης, επιτρέπει τη χρήση τους στη μικρότερη δυνατή ποσότητα (<0,1% του σιτηρεσίου)¹².

4.1 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΠΡΟΛΗΨΗΣ

Οι μυκοτοξίνες είναι σε γενικές γραμμές χημικά και θερμικά σταθερές σύνθετες ενώσεις. Οι περισσότερες τεχνικές πρόληψης εστιάζουν στην απομάκρυνση της μόλυνσης νωρίς κατά την επεξεργασία ή στην παρεμπόδιση των μυκοτοξικών σεων *in vivo* χωρίς όμως την εγγύηση της θρεπτικής ποιότητας.

4.1.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

Υπάρχουν τρεις κύριες τεχνικές επεξεργασίας για τη μείωση της σύστασης σε μυκοτοξίνες στα δημητριακά: κοσκίνισμα, πλύσιμο και γυάλισμα. Σπασμένοι, κατεστραμμένοι και ανώμαλα ανεπτυγμένοι καρποί αποτελούν ιδανικά υποστρώματα ανάπτυξης μυκήτων. Οι περισσότερες μυκοτοξίνες ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε αυτά τα κλάσματα όπως επίσης και στην σκόνη και στα

¹² Thrasher JD: "Poison of the month: Aflatoxins and Aflatoxicosis" (http://www.drthrasher.org/Aflatoxins_and_Aflatoxicosis.html)

θραύσματα που δημιουργούνται κατά το χειρισμό των σπόρων. Ο διαχωρισμός αυτών των πιο μολυσμένων κλασμάτων από τους καρπούς μπορεί να μειώσει σημαντικά την περιεκτικότητα των σπόρων δημητριακών σε μυκοτοξίνες.

4.1.2 ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Ένας μεγάλος αριθμός συμπληρωμάτων θρεπτικών ουσιών έχουν προταθεί ως θεραπευτικά μέσα μειώνοντας τις βλάβες που υφίστανται οι ιστοί από τις μυκοτοξίνες. Αυτά τα θρεπτικά συστατικά περιλαμβάνουν ουδέτερα αμινοξέα, αντιοξειδωτικά και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα συμπληρωματικά αμινοξέα αρχικά μειώνουν το βαθμό επίδρασης των μυκοτοξινών στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Είναι πιθανό τα συμπληρωματικά αμινοξέα (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη) να ανταγωνίζονται με την τρυπτοφάνη για τους ενεργούς μεταφορείς μεταξύ εγκεφάλου και αίματος αναστέλλοντας την πρόσληψη τρυπτοφάνης από τον εγκέφαλο που επάγεται από τις μυκοτοξίνες και συνεπώς την υπερτοξικότητα. Επειδή οι αφλατοξίνες B1, η δεοξυνιβαλενόλη, η T-2 τοξίνη και η ωχρατοξίνη A καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες με υπεροξειδωση των λιπιδίων μελετήθηκαν διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες και βρέθηκε ότι το σελήνιο και οι βιταμίνες A, C και E μειώνουν τις τοξικές επιπτώσεις των μυκοτοξινών *in vivo* και *in vitro*.

Τα αντιοξειδωτικά δρουν σαν αναγωγείς των ανιόντων υπεροξειδίου και με αυτόν τον τρόπο προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες και το DNA από βλάβες που επάγονται από τις μυκοτοξίνες. Τα ω3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αναφέρεται ότι μειώνουν την νεφροπάθεια που επάγεται από τα IgA.

4.1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Οι παράγοντες διαχωρισμού των μυκοτοξινών όπως ο ενεργοποιημένος ξυλάνθρακας, τα ανόργανα άλατα του πυριτίου και η χολεστιραμίνη παρεμποδίζουν την εντερική απορρόφηση των μυκοτοξινών στα ζώα.

Οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες είτε προσροφούν συγκεκριμένες μυκοτοξίνες, είτε απαιτείται υψηλή συγκέντρωση στις ζωοτροφές, προκαλούν άλλες επιπλοκές στην υγεία και συνήθως έχουν πολύ υψηλό κόστος για τη βιομηχανική εφαρμογή. Φυσιολογικά, απαντώνται ως πολυμερή γλυκομαννανών στο

κυτταρικό τοίχωμα ζύμης, έχουν μεγάλη προσροφητική ικανότητα για πρόσδεση πολλών ειδών μυκοτοξινών και παρεμποδίζουν τις μυκοτοξικώσεις σε αρκετά μεγάλο βαθμό.

4.1.4 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Η εφαρμογή μικροοργανισμών ικανών να αποτοξινώνουν τις μυκοτοξίνες σε μη τοξικούς μεταβολίτες στις ζωοτροφές πιστεύεται ότι αναστέλλει τις μυκοτοξικώσεις. Οι μικροοργανισμοί αυτοί δρουν στο γαστρεντερικό σωλήνα πριν την απορρόφηση των μυκοτοξινών. Ένα βακτηριακό στέλεχος για παράδειγμα, που απομονώθηκε από το υγρό στομάχου βρέθηκε ότι απενεργοποιεί τα τριχοθηκένια ανάγοντας τους δακτύλιους οξειδίου.

4.1.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Οι εξάρσεις μολύνσεων από μυκοτοξίνες οδήγησε στον καθορισμό διάφορων στρατηγικών βιοελέγχου όπως η ανάπτυξη ατοξικών μυκήτων βιοελέγχου οι οποίοι ανταγωνίζονται τα υψηλής συγγένειας τοξικογενή στελέχη στο πεδίο, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα των μυκοτοξινών στις σοδειές.

Πιθανοί παράγοντες βιοελέγχου περιλαμβάνουν ατοξικά στελέχη των *A. flavus* και *A. parasiticus* τα οποία μετά την εισαγωγή τους στο έδαφος των αναπτυσσόμενων σοδειών οδηγούν σε 74,3-99,9% μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες στα φυστίκια στις ΗΠΑ (Dorner et al., 1998). Τα κριτήρια που αποτιμούν την αποτελεσματικότητα των παραγόντων βιοελέγχου των μυκοτοξινών, περιλαμβάνουν την ικανότητα αποίκησης των υποστρωμάτων-στόχων ή τμημάτων των φυτών καθώς και την ικανότητα να είναι ενεργοί υπό διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες στο πεδίο ή κατά την αποθήκευση (Bacon et al., 2001).

4.1.6 ΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η κατάλληλη χρησιμοποίηση μικροβιοκτόνων κατά τη διαδικασία της παραγωγής ελαχιστοποιεί τη μυκητιασική λοίμωξη και την παρασιτική εμφάνιση των εντόμων στις σοδειές και συνεπώς την επιμόλυνση από μυκοτοξίνες. Η μόλυνση από

φουμονισίνες μπορεί να μειωθεί με εφαρμογή μυκητοκτόνων (prochloraz, propiconazole, epoxyconazole, tebuconazole cyproconazole and azoxystrobin)

4.1.7 ΑΠΟΤΟΞΙΝΩΣΗ

Η αποτοξίνωση τροφίμων επιμολυσμένων με μυκοτοξίνες επιτυγχάνεται μέσω χημειοπροστασίας ή μέσω εντερικής απορρόφησης. Η χημειοπροστασία των αφλατοξινών περιγράφεται με τη χρησιμοποίηση ενός αριθμού χημικών σκευασμάτων (για παράδειγμα, Oltipraz και Chlorophyllin) ή με τη διατροφική μεσολάβηση όπως μπρόκολα και πράσινο τσάι που είτε αυξάνουν τις διαδικασίες αποτοξίνωσης σε έναν οργανισμό είτε αναστέλλουν την παραγωγή των εποξειδίων τα οποία οδηγούν σε χρωμοσωμική βλάβη (Hayes et al., 1998).

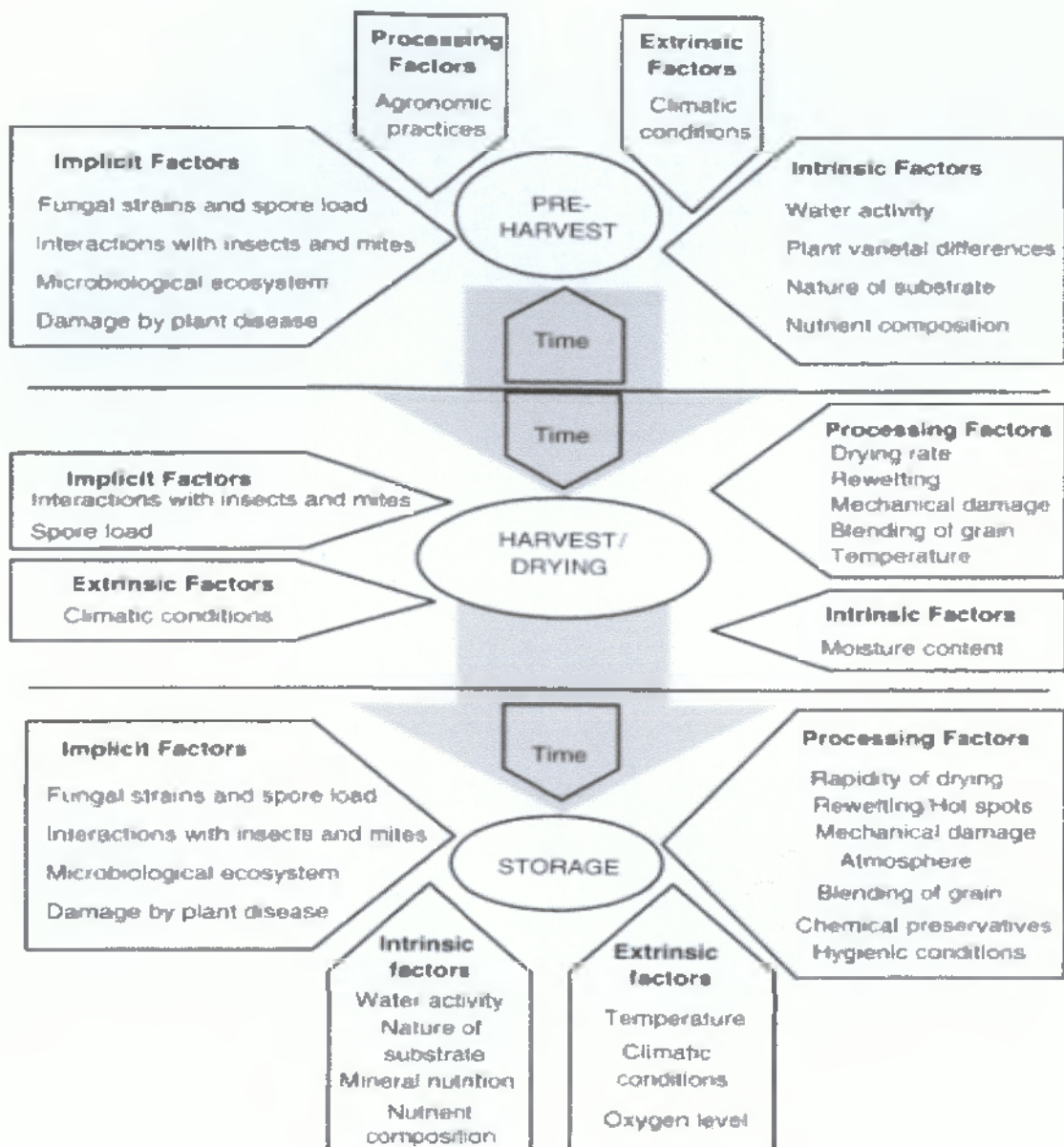
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ

Η αλλοίωση των αποθηκευμένων σπόρων (μούχλιασμα) από τους μύκητες καθορίζεται από ένα εύρος παραγόντων, οι οποίοι ταξινομούνται σε 4 κατηγορίες:

1. ενδογενείς διατροφικοί παράγοντες
2. εξωγενείς παράγοντες
3. παράγοντες κατεργασίας
4. μικροβιακοί παράγοντες

1. Βασικοί Έλεγχοι Μετά τη Συγκομιδή

- Ακριβής ρύθμιση μετρήσεων υγρασίας.
- Αποτελεσματική και άμεση ξήρανση των νωπών σπόρων δημητριακών. Παράλληλη ρύθμιση του χρόνου αποθήκευσης και της θερμοκρασίας πριν τη ξήρανση με σκοπό την εξασφάλιση των βέλτιστων συνθηκών υγρασίας. Σιτάρι, κριθάρι, βρώμη 14–14.5%, καλαμπόκι 14%, ρύζι 13–14%.
- Υποδομές για ταχεία απόκριση περιλαμβάνοντας προετοιμασία για διαχωρισμό και κατάλληλες συνθήκες μεταφοράς



Εικόνα 4.1: Αλληλεπίδραση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων στην τροφική αλυσίδα πριν τη συγκομιδή, κατά τη συγκομιδή /ξήρανση και κατά την αποθήκευση

- Κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης σε όλα τα στάδια όσον αφορά τον έλεγχο υγρασίας και θερμοκρασίας, τη γενικευμένη διατήρηση των κανόνων υγιεινής κατά την αποθήκευση με σκοπό την παρεμπόδιση των παρασίτων.
- Ικανότητα ακριβούς αναγνώρισης των μυκητιασικών μολύνσεων, των σταδίων και των επιπέδων των μυκοτοξινών.

Λειτουργία των εγκεκριμένων ενισχυτικών συστημάτων. Το γεγονός αυτό απαιτεί ρυθμίσεις για αποδοχή και απόρριψη.

2. Πρόληψη μολύνσεων πριν τη συγκομιδή

- Κατάλληλη επιλογή υβριδίων καλαμποκιού
- Ισορροπημένη γονιμοποίηση
- Αποφυγή αργοπορημένης συγκομιδής
- Αποτελεσματικός έλεγχος παρασίτων

3. Πρόληψη μολύνσεων μετά τη συγκομιδή

- ελαχιστοποίηση του χρόνου μεταξύ συγκομιδής και ξήρανσης
- αποτελεσματικός καθαρισμός του καλαμποκιού πριν την αποθήκευση
- επαρκής ξήρανση
- τήρηση κανόνων υγιεινής
- απουσία παρασίτων στην αποθήκευση με θέρμανση
- καθαρή ανιχνευσιμότητα από το πεδίο στην αποθήκη

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Οι μυκοτοξίνες είναι ένα πολύ σοβαρό πρόβλημα στην παραγωγή ασφαλών και ποιοτικών τροφίμων με άμεσες επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων και ζώων
- Τα σιτηρά και οι ξηροί καρποί πολύ συχνά είναι μολυσμένοι
- Έλεγχος περιβαλλοντικών παραμέτρων (π.χ. υγρασία) μπορεί να ελέγξει τις μυκοτοξίνες μετά τη συγκομιδή
- Βιολογική αντιμετώπιση των μυκοτοξινών πριν τη συγκομιδή μπορεί να είναι αποτελεσματική
- Η παραγωγή τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών από μυκοτοξικογόνους μύκητες αποτελεί σήμερα ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα για τη διασφάλιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων, της υγείας του ανθρώπου και των ζώων.
- Επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων ελέγχου και προσδιορισμού μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές.
- Θέσπιση ορίων σε επίπεδο ΕΕ.
- Τοξικολογικές και επιδημιολογικές μελέτες. Μελέτες επικινδυνότητας για τον άνθρωπο.
- Ανάπτυξη και εφαρμογή προγραμμάτων ολοκληρωμένης διαχείρισης των μυκοτοξινών στο αγρό.
- Ορθή χρήση μυκητοκτόνων (προ- ή/και μετασυλεκτικά).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Γαλανοπούλου Ν, Ζαμπετάκης Γ, Μαυρή Μ, Σιαφάκα Α: "Διατροφή και Χημεία Τροφίμων", Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα 2007, σ. 289.

Μπαλατσούρας Γ., «Μικροβιολογία Τροφίμων: βακτήρια – ζύμες – μύκητες», 1992

ΑΓΓΛΙΚΗ

Bennett, J. W., and R. Bentley. 1999. Pride and prejudice: the story of ergot. *Perspect. Biol. Med.* 42:333–355.

Blanc, P. J., M. O. Loret, and G. Goma. 1995. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol. Lett.* 17:291–294.

J.P. Rheeder, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, G.S. Shephard, D.J. Schalkwyk, *Phytopathologia* 82, 353,(1992)

JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 53rd Report. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series 44 (2000)

Manabe, M. 2001. Fermented foods and mycotoxins. *Mycotoxins* 51:25–28.

N.Belli, S.Marin, V.Sanchis, A.J.Ramos, Ochratoxin A (OTA) in Wines, Musts and Grape Juices: Occurrence, Regulations and Methods of Analysis, *FoodScience and Technology International*;8, 325, (2002)

P.A.Murphy, S.Hendrich, C.Landgren, and C.M.Bryant, *Food Mycotoxins: An Update, Scientific Status Summary, The Institute of Food Technologists, (2006)*

S.M. Romeroa, R.M. Comerioa, G. Larumbea, A. Ritienib, G. Vaamondea, V. Fernandez Pintoa Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina, *International Journal of Food Microbiology*, 104, 43–49, (2005)

Scientific Committee on Food: opinion on ochratoxin A, CS/CNTM/MYC/14 final Annex II to Document XXIV/2210/98 European Commission Bruxelles (1998)

Understanding Mycotoxins, Patricia A. Murphy, Ph.D., Suzanne Hendrich, Ph.D., Cindy Landgren, Ph.D., *Foodtechnology* 06(2006)